

María del Carmen Menacho Miralles

Las amebas de vida libre en aguas
superficiales con presión
ganadera: Estudio de su papel
como reservorio de bacterias
resistentes a antibióticos y
estrategias de desinfección desde
la perspectiva One Health

Director/es

Goñi Cepero, María Pilar
Ormad Melero, María Peña

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE EN AGUAS
SUPERFICIALES CON PRESIÓN GANADERA:
ESTUDIO DE SU PAPEL COMO RESERVORIO DE
BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS Y
ESTRATEGIAS DE DESINFECCIÓN DESDE LA
PERSPECTIVA ONE HEALTH**

Autor

María del Carmen Menacho Miralles

Director/es

Goñi Cepero, María Pilar
Ormad Melero, María Peña

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2024

Tesis Doctoral

Las amebas de vida libre en aguas superficiales
con presión ganadera: Estudio de su papel
como reservorio de bacterias resistentes a
antibióticos y estrategias de desinfección desde
la perspectiva *One Health*

Autora

Carmen Menacho Miralles

Directoras

M^a Peña Ormad Melero

Pilar Goñi Cepero

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

Escuela de Doctorado

2024



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza



Departamento de
Microbiología, Pediatría
Radiología y Salud Pública
Universidad Zaragoza

Las amebas de vida libre en aguas superficiales
con presión ganadera: Estudio de su papel
como reservorio de bacterias resistentes a
antibióticos y estrategias de desinfección
desde la perspectiva *One Health*

Autora

Carmen Menacho Miralles

Directoras

M^a Peña Ormad Melero

Pilar Goñi Cepero

2024



Instituto Universitario de Investigación
en Ciencias Ambientales
de Aragón
Universidad Zaragoza

Dña. M^a PEÑA ORMAD MELERO, Catedrática de Universidad del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente en el Área de Tecnologías del Medio Ambiente y **Dña. PILAR GOÑI CEPERO**, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública, en el área de Parasitología, ambas de la Universidad de Zaragoza,

INFORMAN,

Que el trabajo contenido en la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada:

“Las amebas de vida libre en aguas superficiales con presión ganadera: Estudio de su papel como reservorio de bacterias resistentes a antibióticos y estrategias de desinfección desde la perspectiva One Health” elaborada por **Dña. CARMEN MENACHO MIRALLES**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y se corresponde y adecúa al Plan de Investigación aprobado por la Comisión Académica del programa de Doctorado Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmamos este certificado en Zaragoza, a 19 de Agosto de 2024.

Goñi Cepero, María Pilar

Ormad Melero, María Peña

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias al Gobierno de Aragón y al Banco Santander por la financiación que ha hecho posible la realización de esta tesis doctoral y las estancias de investigación. Agradezco también al IUCA y a la Universidad de Zaragoza su apoyo económico e institucional, fundamental para desarrollar este proyecto. De igual manera, quiero dar las gracias a las instituciones que me han acogido durante mis estancias de investigación: a la Universidad de Cuenca y al Instituto de Salud Global de Barcelona, por brindarme hospitalidad y un entorno académico y profesional en el que he podido crecer y desarrollar parte de mi trabajo.

Entrando en un terreno más personal, me gustaría dar las gracias a las personas que han compartido este desafío conmigo y me han respaldado y ayudado a lo largo de esta etapa; sois muchas quienes, de forma directa o indirecta, habéis formado parte de este proceso.

A mis directoras, Peña y Pili, por creer en mí y apoyarme, por estar pendientes, especialmente en los momentos “in extremis” de cuenta atrás. Han sido seis largos años juntas, cinco como doctoranda, en los que he aprendido mucho de vosotras y me he formado como profesional en este fascinante sector del agua. Gracias por acompañarme y respaldarme en las mil y una actividades de las que he querido formar parte, por los consejos y las enseñanzas.

A Patricia, piedra angular del laboratorio, por tu incansable ayuda (especialmente con las PCR) y por acompañarme día tras día en este camino.

A Dayana, compañera de batallas y apoyo incondicional. ¡Lo logramos! Doy gracias por haber hecho este viaje contigo, por reír y llorar juntas. Gracias por dejarme formar parte de tu camino también; ojalá haber podido aportarte una pequeña parte de todo el cariño y soporte que me has dado tú a lo largo de estos años.

A las y los compañeros del grupo de Agua y Salud Ambiental y del Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente, especialmente a Samuel, por tu extensa paciencia y continua ayuda siempre que lo he necesitado, al Doctor Clavel, por compartir conmigo tu sabiduría, a Rosa, por tu disposición e interés constante y a Begoña, por estar siempre disponible y ser facilitadora nata.

A Cristina, por dar luz y color a tantos días (de prácticas y de no prácticas). Gracias por tu energía, por tu cariño y por compartir la ilusión al observar los “bichitos” del agua.

A Verónica, por “amadrinarme” en Ecuador. Por estar siempre pendiente de mí a lo largo de toda mi estancia, por tu atención, tu cariño, las pláticas y los cafés de mujeres, por tu esfuerzo y constancia. Gracias por estar al pie del cañón conmigo, mano a mano, desde el principio hasta el final, incluso cuando yo ya no podía más.

A María Eulalia, por tu cariño y acogida. A Giovani por brindarme espacio, tiempo y material para que no me faltara nada. A Silvana, por todas las facilidades brindadas.

A Eli y Lau, por vuestra incansable ayuda con todos los papeleos de la estancia en Barcelona, pero sobre todo por vuestro cariño, ilusión, paz, dedicación, apoyo y alegría inagotables. Fuisteis luz, cálida y hogareña, en el momento que más lo necesitaba. Fuisteis la

energía que necesitaba para recargar “las pilas” de ilusión y afrontar el final de esta aventura. Fui muy feliz en Barcelona con vosotras y gracias a vosotras, gracias.

A Sandra, Nuria y Arturo por acompañarme día a día durante mi estancia. Por las risas, las enseñanzas compartidas, los cotilleos y por tanto cariño desinteresado en tan poco tiempo. Os debo un viaje, lo tengo presente.

No puedo olvidarme tampoco de aquellas personas que fueron doctorandas alguna vez y lo suficientemente valientes como para abandonar este camino. A vosotras y vosotros, me gustaría dedicar también esta tesis.

Fuera del laboratorio, hay una larga lista de personas que me han acompañado a lo largo de esta etapa y su ayuda ha sido indispensable para concluirla. Vuestras metodologías han sido de lo más diversas, pero todas han llegado a la misma conclusión: hacerme feliz y darme fuerza, energía y motivos para continuar y no rendirme. Todas y todos, de alguna manera, sois partícipes de estas páginas.

Gracias Alex, Jaz, Santi, Jhony, México (y vuestras familias), Eri, Esney, Eve y Ericka, por hacer de Ecuador mi hogar, incluso durante la pandemia.

Gracias Maribeni y Javi por vuestra motivación, contagiosa. Gracias a las Growing, por los momentos de evasión, dejándonos llevar por la música y el baile.

Gracias al rugby, por ser motor y fuente de personas hermosas y valiosas en mi vida. Gracias Íberas, Carneras, Yaguas y Sancu. Gracias Txell, Burgos, Ido, Sevi, Ana, Bea, Mai, Laia, Lu, Frany, Mire, Ani, Lau, Andrea y Trampo, por ser colchón y red. Gracias Lizara, por llenarme de amor.

Gracias Mare por ser paz y por despertar en mí la pasión de plantar; has conseguido poner color a días muy grises.

Gracias Nancy, Lau, Ana, Tere, Pepelú, Estefanía, Mitzi, Eri, Clara (e Iván) por siempre “estar”, pase lo que pase, sea donde sea.

Gracias a mi familia, involucrada toda ella de una u otra forma en toda esta etapa. Gracias Edu por ser ejemplo de constancia y sacrificio, por tus enseñanzas (las que dices y las que callas) y por tu paciencia ante los miles de favores que te pido. Gracias papá y gracias mamá por ser apoyo incondicional, por celebrar cada logro, por pequeño que sea, y por tener siempre un sí ante todo lo que pueda necesitar.

Gracias Jaime, por acompañarme todo el camino.

“La belleza está en los ojos de quien mira”

Margaret Wolfe Hungerford

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2'NET: 2'-etil netilmicina

AAC: aminoglucósido acetiltransferasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEMPS: Asociación Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AF: anfenicoles

AG: aminoglucósidos

AK: amikacina

AMP: ampicilina

ANN: agar no nutritivo

ANT: aminoglucósido nucleotidiltransferasa o adenililtransferasa

AP: apramicina

APH: aminoglucósido fosfotransferasas

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN de transferencia

AS: agar sangre

ATP: adenosín trifosfato

ATM: aztreonam

AVL: ameba de vida libre

AZM: azitromicina

BE: bacteria endocitobionte

BERA: bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos

BL: betalactámicos

BRA: bacterias resistentes a antibióticos

CAZ: ceftazidima

CC: clindamicina

CE: Comunidad Europea

CHE: Confederación Hidrográfica del Ebro

CIP: ciprofloxacino

CL: cloranfenicol

CLSI: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (“Clinical and Laboratory Standards Institute”)

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

CONS: *Staphylococcus* coagulasa-negativos

COPS: *Staphylococcus* coagulasa-positivos

CRO: ceftriaxona

CV: coeficiente de variación

DBP: subproductos de desinfección (“disinfection by-products”)

DK: dibekacina

E: eritromicina

EDAR: estaciones depuradoras de aguas residuales

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético

EGM: elementos genéticos móviles

EM: estación de muestreo

EMA: enzimas modificadoras de aminoglucósidos

EPA: Agencia de Protección Ambiental (“Environmental Protection Agency”)

ETAP: estación de tratamiento de aguas potables

EU: Unión Europea (“European Union”)

EUCAST: Comité Europeo de la Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”)

FAC: cloro libre (“free available chlorine”)

FAD: flavina adenine dinucleótido

FEP: cefepima

FOX: ceftioxitina

FQN: fluoroquinolonas

GM: gentamicina

GRA: genes de resistencia a antibióticos

H: higromicina

I: susceptible a exposición aumentada

IACS: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud

IG: islas genómicas

IMI: imipenem

INT: integrón

ISBN: Número Internacional Normalizado de Libros (“International Standard Book Number”)

ISO: Organización de Normalización Internacional (“International Standardization Organization”)

ISSN: Número Internacional Normalizado de Publicaciones Seriadas (“International Standard Serial Number”)

IUCA: Instituto Universitario de Ciencias Ambientales de Aragón

JCR: Informe de citas de revistas (“Journal Citation Reports”)

K: kanamicina

LB: Luria Bertani

LC: lincosamidas

LCP: proteína LytR-Cps2A-Psr

MALDI-TOF: espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un detector de iones (“Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight”)

MC: macrólidos

MEM: meropenem

MH: Müller Hinton

MNO: minociclina

MOD: materia orgánica disuelta

MR: multirresistente

MRA: multirresistencia a antibióticos (índice)

MRX: multirresistencia extendida

NAL: ácido nalidíxico

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (“National Center for Biotechnology Information”)

NJ: *Neighbor-Joining*

NM: neomicina

NMP: número más probable

NOR: norfloxacino

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMSA: Organización Mundial de Salud Animal

OX: oxacilina

PABA: ácido para-aminobenzoico

PAO: Procesos avanzados de oxidación

PAS: solución salina de Neff's modificada

PBP: proteínas de unión a penicilina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD: Programa de Doctorado

PEN: penicilina

PIP: piperacilina

PM: paromomicina

PPYG: proteosa peptona, extracto de levadura, glucosa

PR: panresistencia

PRAN: Plan de Reducción de Antibióticos

QN: quinolonas

R^r: resistente

RA: rifampicina

RCS: especies reactivas de cloro

RD: Real Decreto

RF: rifamicinas

ROS: especies reactivas de oxígeno ("reactive oxygen species")

RS: radiación solar

S^s: susceptible

SAM: adenosil-L-metionin

SCI: Índice de Citas de Ciencia ("Science Citation Index")

SDS: dodecilsulfato sódico

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SESPAS: Sociedad Española de Salud Pública y Administración Sanitaria

SFE: suero fisiológico estéril

SI: secuencias de inserción

SIS: sisomicina

SOD: superóxido dismutasa

SODIS: desinfección solar

SPC: espectinomicina

ST: estreptomicina

SXD: sulfadiazina-diaminopirimidina

SXT: sulfametoxazol-trimetoprim

TBE: Tris, ácido bórico, EDTA

TET: tetraciclina

TGH: transferencia genética horizontal

TK: Inactivación total (“total kill”)

Tn: transposón

TrmK: ARNt adenina(22)-N(1)-metiltransferasa

TT: tetraciclinas

UE: Unión Europea

UV: ultravioleta

VAV: Vigilancia Veterinaria de Resistencia a Antibióticos

ÍNDICE

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	1
1. Control microbiológico del agua	3
1.1. Normativas e indicadores	3
1.2. Tratamientos de desinfección	6
1.2.1. Técnicas de desinfección y oxidación convencionales	6
1.2.2. Procesos avanzados de oxidación	11
2. Características de las amebas de vida libre	15
2.1. Hábitat y ciclo de vida	15
2.2. Interacción con otros microorganismos	16
2.3. Las amebas de vida libre en el ciclo urbano del agua	18
3. Los antibióticos y la resistencia bacteriana a los antibióticos	20
3.1. Mecanismos de acción y clasificación de los antibióticos	20
3.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos	23
3.3. Mecanismos de transferencia horizontal mediada por elementos genéticos móviles: los integrones	26
3.4. Problemática de la resistencia a antibióticos	30
3.5. Efectos del consumo de antibióticos por el sector ganadero	31
4. La perspectiva “One Health”	35
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y APORTACIONES	37
1. Hipótesis de trabajo	39
1.1. Las amebas de vida libre como reservorio y vector de bacterias endocitobiontes: riesgos para la salud pública	39
1.2. El papel de las amebas de vida libre en la diseminación de resistencia a antibióticos: las BERA	40
1.3. Tratamientos de desinfección frente amebas de vida libre y bacterias endocitobiontes	41
2. Objetivos	43
3. Marco de desarrollo	44
4. Principales aportaciones derivadas de la investigación	45
4.1. Contribución científica	45
4.2. Contribución a los Objetivos de Desarrollo Sostenible	48

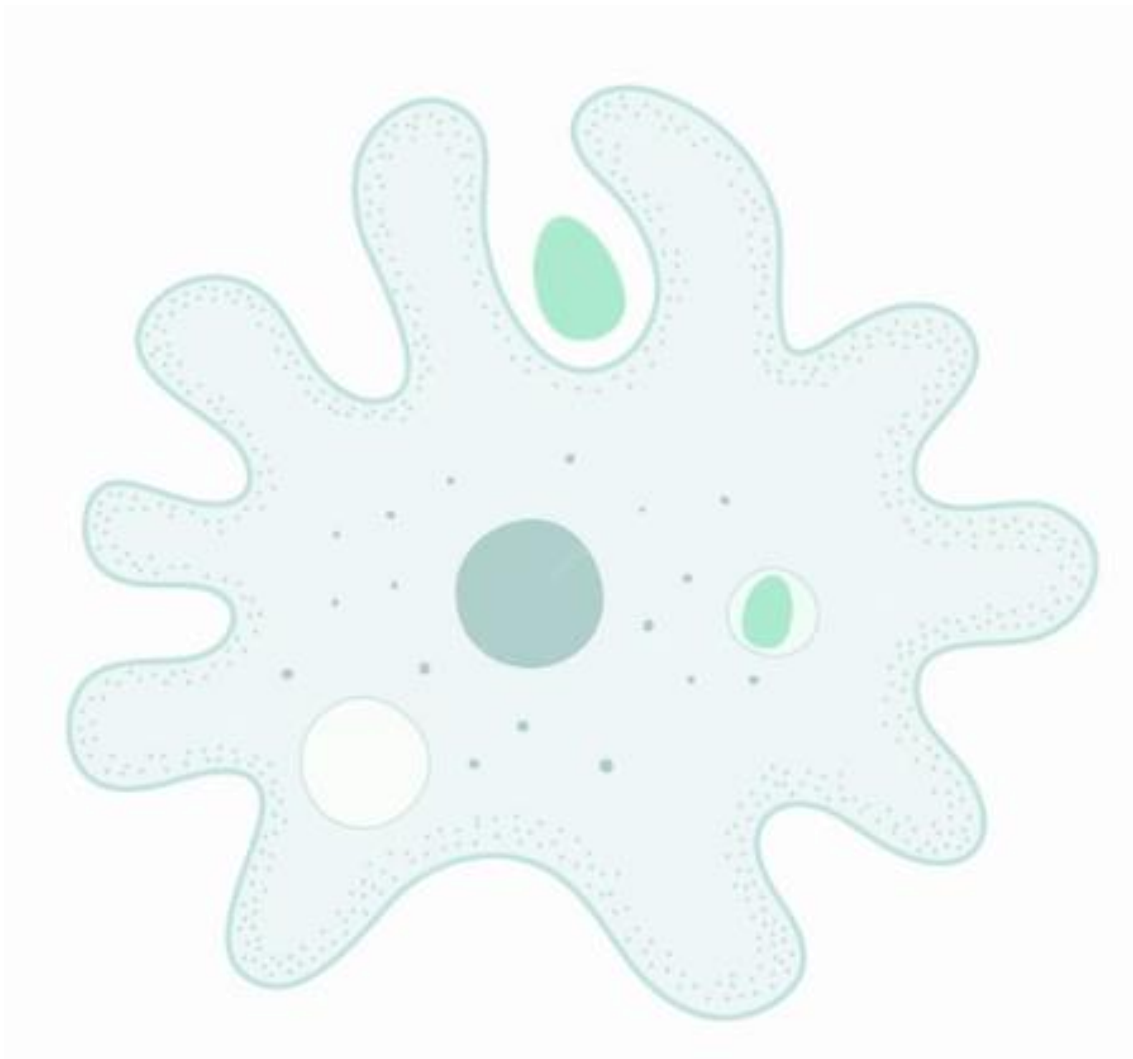
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. Aislamiento y caracterización de amebas de vida libre presentes en aguas superficiales	53
1.1. Muestras de agua	53
1.2. Medios de cultivo	54
1.3. Aislamiento, cultivo y axenización	55
1.4. Determinación de la concentración	56
1.4.1. Recuento mediante hemocitómetro	56
1.4.2. Método del número más probable	57
1.5. Identificación de los aislamientos mediante técnicas de biología molecular	60
1.5.1. Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa	60
1.5.2. Electroforesis en gel de agarosa y visualización	62
1.5.3. Purificación del producto de PCR, secuenciación, análisis y registro de secuencias	64
1.5.4. Análisis filogenético	65
2. Extracción, aislamiento, conservación e identificación de bacterias endocitobiontes a partir de amebas de vida libre	68
2.1. Cepas de estudio	68
2.2. Medios de cultivo	68
2.3. Extracción, aislamiento y conservación	69
2.4. Identificación mediante MALDI-TOF	70
3. Evaluación de la resistencia y la presencia de genes de resistencia a antibióticos de las bacterias endocitobiontes	73
3.1. Cepas de estudio	73
3.2. Determinación de la sensibilidad a antibióticos y evaluación del perfil de resistencias	73
3.2.1. Antibiógrama disco-placa	73
3.2.2. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	76
3.2.3. Clasificación R/I/S	77
3.2.4. Índice MRA	78
3.3. Estudio de la presencia de integrones	78
4. Evaluación de la efectividad de tratamientos de desinfección para inactivar <i>Acanthamoeba</i> y sus bacterias endocitobiontes	81
4.1. Cepas de estudio	81
4.2. Agentes de desinfección, concentración residual y dosis de desinfectante	81
4.2.1. Hipoclorito de sodio	82
4.2.2. Peróxido de hidrógeno	83
4.2.3. Radiación solar	83
4.3. Procedimiento	85
4.3.1. Preparación, condiciones, desarrollo y toma de muestras	85
4.3.2. Evaluación de la inactivación de <i>Acanthamoeba</i>	85
4.3.3. Evaluación de la inactivación de las bacterias endocitobiontes	86
4.3.4. Evaluación de la efectividad del tratamiento de desinfección	86

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN RELATIVOS A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA LIBRE Y SUS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES PRESENTES EN AGUAS DE RÍO	89
1. Amebas de vida libre en aguas de río	91
1.1. Aislamiento e identificación de amebas de vida libre	91
1.2. Análisis filogenético	96
2. Extracción, aislamiento e identificación de bacterias endocitobiontes	101
2.1. Extracción y aislamiento	101
2.2. Identificación	103
2.3. Estudios previos y definición de nuevas bacterias endocitobiontes	111
3. Impacto humano en las poblaciones de amebas de vida libre y bacterias endocitobiontes en aguas superficiales de la Cuenca del Ebro. Relevancia y riesgos asociados	118
4. Principales conclusiones del Capítulo IV	132
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN RELATIVOS AL PAPEL DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE COMO RESERVORIO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	133
1. Estudio fenotípico del perfil de resistencias de las bacterias endocitobiontes con énfasis en antibióticos aminoglucósidos	135
1.1. Evaluación de la sensibilidad a antibióticos	135
1.2. Evaluación de la sensibilidad a aminoglucósidos	144
1.2.1. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	144
1.2.2. Perfil de resistencia a aminoglucósidos y posibles mecanismos de resistencia	151
1.3. Perfil de resistencias de las bacterias endocitobiontes	162
2. Estudios previos y definición de nuevas bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA)	172
3. Estudio genotípico de las bacterias endocitobiontes: presencia y caracterización de integrones	174
3.1. Presencia de integrones	174
3.2. Caracterización de los integrones	183
4. El papel de las amebas de vida libre como reservorio y vector de bacterias resistentes a antibióticos	191
5. Impacto humano en la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos desde la perspectiva “One Health”. Relevancia y riesgos asociados	201
6. Principales conclusiones del Capítulo V	207

CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN RELATIVOS A LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DESINFECTANTES FRENTE AMEBAS DE VIDA LIBRE Y SUS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES	209
1. Puesta en marcha de un protocolo para la evaluación de la inactivación de amebas de vida libre y sus bacterias endocitobiontes	211
1.1. Revisión de metodologías existentes	211
1.2. Consideraciones preliminares	212
1.3. Valoración de los métodos para determinar la supervivencia de <i>Acanthamoeba</i>	215
1.4. Valoración de los métodos para determinar la supervivencia de las bacterias endocitobiontes	222
1.5. Determinación del rango de dosis de desinfectante	224
2. Inactivación de <i>Acanthamoeba</i> y sus bacterias endocitobiontes mediante tratamientos de desinfección convencionales	228
2.1. Inactivación de <i>Acanthamoeba</i> mediante hipoclorito de sodio	228
2.2. Inactivación de bacterias endocitobiontes mediante hipoclorito de sodio	231
2.3. Inactivación de <i>Acanthamoeba</i> mediante peróxido de hidrógeno	233
2.4. Inactivación de bacterias endocitobiontes mediante peróxido de hidrógeno	235
2.5. Inactivación de <i>Acanthamoeba</i> mediante radiación solar	237
2.6. Inactivación de bacterias endocitobiontes mediante radiación solar	239
3. Inactivación de <i>Acanthamoeba</i> y sus bacterias endocitobiontes mediante tratamientos avanzados de oxidación	241
3.1. Inactivación de <i>Acanthamoeba</i> mediante combinación de hipoclorito sódico y radiación solar	241
3.2. Inactivación de bacterias endocitobiontes mediante combinación de hipoclorito sódico y radiación solar	247
3.3. Inactivación de <i>Acanthamoeba</i> mediante combinación de peróxido de hidrógeno y radiación solar	250
3.4. Inactivación de bacterias endocitobiontes mediante combinación de peróxido de hidrógeno y radiación solar	252
4. Influencia del origen de la <i>Acanthamoeba</i> en la efectividad de los tratamientos de desinfección, aplicaciones, consideraciones y perspectivas futuras	256
5. Principales conclusiones del Capítulo VI	261
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES	263
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA	267
ANEXO I	313
ANEXO II	321

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO



1. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AGUA

El acceso a agua limpia y segura resulta imprescindible para conseguir una buena salud pública; su contaminación impacta directamente sobre la salud de millones de personas y en consecuencia, sobre su calidad de vida. Por ello, se han desarrollado diferentes operaciones y procesos que, aplicados al tratamiento del agua, permiten su uso, en principio, sin riesgo sanitario asociado. Estas tecnologías han sido desarrolladas en muchas ocasiones como consecuencia del establecimiento de normas de calidad asociadas, relacionadas con requisitos mínimos microbiológicos y fisicoquímicos que garanticen **la seguridad del agua** a lo largo de sus diferentes usos y reusos, así como para **prevenir enfermedades** de transmisión hídrica a lo largo de todo el ciclo urbano del agua (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2022; Pichel y col., 2019).

A continuación, se describen las normativas e indicadores de calidad microbiológica del agua vigentes actualmente en España, así como los tratamientos de desinfección de relevancia para la presente Tesis Doctoral.

1.1. NORMATIVAS E INDICADORES

El ciclo urbano o ciclo integral del agua engloba el conjunto de etapas por las que atraviesa el agua desde su toma en el medio natural, su uso y vuelta al entorno. Este ciclo abarca la captación y tratamiento del agua, su almacenamiento y su distribución a la población para los distintos usos (doméstico, industrial, agropecuario, urbano, recreativo, etc) y su saneamiento posterior para o bien, devolverla al ecosistema acuático (depuración) o bien, reutilizarla (regeneración) (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, s.f.).

El riesgo de contaminación del agua debe minimizarse llevando a cabo un control de la presencia de microorganismos a lo largo de su ciclo integral. Debido a la dificultad que supone detectar todos los patógenos presentes, se emplean organismos indicadores, siendo los más comunes las bacterias coliformes fecales y *Escherichia coli*, que sirven como indicador de contaminación fecal (Lanao, 2012).

Para el abastecimiento de agua a las poblaciones, el agua se capta y potabiliza en una estación de tratamiento de aguas potables (ETAP), donde se somete a una serie de tratamientos fisicoquímicos que permiten asegurar su calidad (química y microbiológica) de acuerdo con los criterios establecidos por la legislación vigente. En España, y hasta el 2023, el Real Decreto

140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, exigía para este control de calidad de las aguas, emplear como indicadores de calidad microbiológica el recuento de coliformes totales, enterococos y *Clostridium perfringens*, bacteria menos frecuente pero mucho más resistente (Lanao, 2012). Recientemente, se ha modificado esta regulación de forma que, el Real Decreto 3/2023 de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro, es la regulación vigente. Esta regulación añade a los criterios e indicadores microbiológicos un límite de *Legionella* presente en el agua potable y ciertos casos en los que se habrá de analizar la presencia del protozoo *Cryptosporidium* “u otros microorganismos o parásitos que señale la autoridad sanitaria”. Se añaden además controles de *Legionella* en grifos de edificios prioritarios (grandes edificios o locales, distintos a las viviendas particulares, con un elevado número de usuarios que pueden verse expuestos a riesgos relacionados con el agua, en particular grandes locales de uso público) y de *Legionella* y *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales o centros sanitarios.

En relación a esta bacteria, y dado el incremento de casos de legionelosis en Europa y, especialmente, en los países mediterráneos (Samuelsson y col., 2023), el Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis insta a revisar sistemas de agua sanitaria, torres de refrigeración y condensadores evaporativos, equipos de enfriamiento evaporativo, centrales humidificadoras industriales, humidificadores, sistemas de agua contra incendios, sistemas de agua climatizada y aerosolización, fuentes ornamentales, sistemas de riego por aspersión, dispositivos de enfriamiento evaporativo por pulverización, sistemas de lavado de vehículos, máquinas de riego o baldeo y vehículos de limpieza viaria, instalaciones de uso sanitario/terapéutico, y cualquier instalación que utilice agua en su funcionamiento y produzca o sea susceptible de producir aerosoles.

Después de su uso, las aguas residuales son tratadas previa emisión al medio. La Directiva del Consejo 91/271/CEE, modificada por la Directiva 98/15/CE, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas establece los requisitos que han de cumplir las aguas depuradas para poder ser vertidas al medio acuático. Para ello, se han establecido una serie de parámetros que incluyen la demanda bioquímica de oxígeno, la demanda química de oxígeno y el total de sólidos suspendidos. En caso de verterse a zonas sensibles propensas a eutrofización, se establecen también límites de fósforo total y nitrógeno total. Sin embargo, no se establece ningún criterio microbiológico, asumiendo que los patógenos fecales disminuyen su concentración al encontrarse fuera de su hábitat (López, 2018) y pasando por alto la emisión de microorganismos

potencialmente patógenos por aguas depuradas al medio ambiente. Vale la pena mencionar que el 80 % de las aguas residuales a nivel mundial no son tratadas (Naciones Unidas, 2018).

Próximamente, se prevé la derogación de la Directiva 91/271 a través de una nueva Directiva del Parlamento y del Consejo Europeo sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas (Comisión Europea, 2022), en la que se establece un plan de implementación de medidas desde el 2025 hasta el 2040. Entre las medidas planteadas, se incluye el control de la reducción de microcontaminantes químicos y la incorporación de un sistema de monitoreo para vigilar parámetros relevantes para la salud pública, a determinar por el estado miembro pero que han de incluir, por el momento, el SARS-CoV-2 y la resistencia a antibióticos.

La reutilización del agua regenerada es una práctica cada vez más frecuente, debido a la escasez y a la cada vez mayor demanda de agua (Alcalde-Sanz y Gawlik, 2014). En España, el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, establece los criterios de calidad según los usos de esta: urbanos, agrícolas, industriales, recreativos o ambientales. Los parámetros incluyen nematodos intestinales, *Escherichia coli*, sólidos en suspensión, turbidez y, dependiendo del uso, límites de *Legionella* si existe riesgo de aerosolización (para usos urbanos, industriales, agrícola, recreativos), *Taenia saginata* y *Taenia solium* (para usos agrícolas), detectar la presencia o ausencia de *Salmonella* (para usos agrícola e industrial), nitrógeno total y nitratos (para uso ambiental).

En la Figura I.1 se muestra esquemáticamente el ciclo urbano del agua y las principales normativas vigentes que regulan su uso, calidad y control de la contaminación.

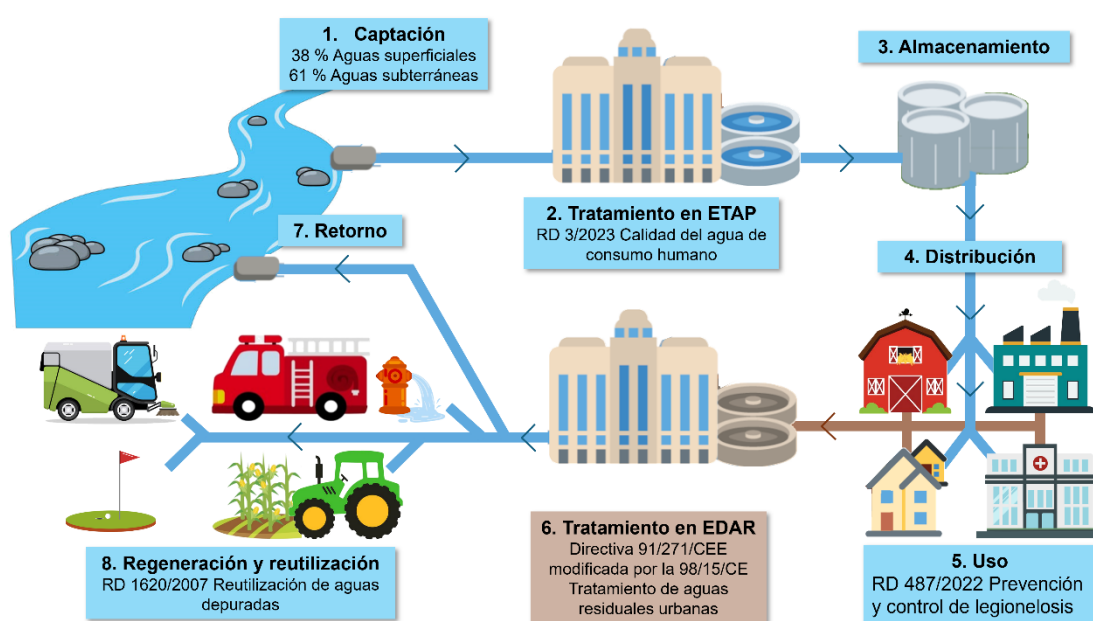


Figura I.1. Ciclo urbano del agua y principales normativas vigentes.

1.2. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

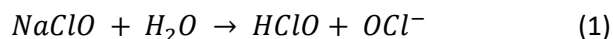
En el Mundo, 2200 millones de personas no tienen acceso a agua limpia y segura, y cerca de un millón fallecen anualmente por enfermedades diarreicas transmitidas por vía hídrica (Organización Mundial de la Salud, 2023). Numerosos microorganismos de diferente índole (bacterias, virus, protozoos, helmintos) se transmiten por el agua y pueden causar enfermedades que lleven a la muerte. Para combatirlo, se han desarrollado diferentes tratamientos de desinfección que, convencionalmente, se han llevado a cabo por diferentes métodos: aplicación de agentes químicos, como el cloro, físicos, como la radiación ultravioleta, o mecánicos, como la filtración (Lanao, 2012). Posteriormente, se han desarrollado tratamientos más eficientes que eliminan contaminantes emergentes y evitan la formación de subproductos peligrosos como los procesos avanzados de oxidación (PAO) o la ósmosis inversa, entre otros (Ma y col., 2021; Malato y col., 2009; Totaro y col., 2022).

1.2.1. Técnicas de desinfección y oxidación convencionales

Cloro

El cloro es el desinfectante más ampliamente utilizado, especialmente en los tratamientos de potabilización, debido a su eficacia contra un amplio espectro de microorganismos y su bajo coste. Su empleo se remonta a finales del siglo XIX y continúa utilizándose hasta la actualidad. Puede aplicarse en forma de gas, hipoclorito cálcico o hipoclorito sódico. Este último, coloquialmente conocido como lejía, es la forma más común de utilizarse (Lanao, 2012; Environmental Protection Agency, EPA, 1999).

El hipoclorito sódico se disocia en agua, formando ácido hipocloroso (HClO) que, a su vez, se disocia en ion hipoclorito OCl^- , tal como indica la reacción (1). El cloro molecular, el ácido hipocloroso y el ion hipoclorito son formas intercambiables en función del pH de la solución (Figura I.2). A pHs inferiores a 1, la forma de cloro molecular (Cl_2) es la más abundante; hasta pH 8-9 predomina el hipoclorito y, a pHs superiores, el ion hipoclorito. Así, a pH neutro predomina HClO, que es la forma con mayor potencial de oxidación ($E^\circ = 1,49 \text{ V}$) y, por tanto, con mayor poder desinfectante (Lanao, 2012; Remucal y Manley, 2016).



El término “cloro libre” (FAC, por sus siglas en inglés) se refiere al cloro presente en forma de ácido hipocloroso, ion hipoclorito o cloro elemental disuelto. Este se ha de diferenciar del cloro combinado y el cloro total. El cloro total representa la suma del cloro libre y el cloro combinado.

El cloro combinado lo constituye la fracción del cloro presente en forma de cloraminas y cloraminas orgánicas. Las cloraminas son derivados del amonio por sustitución de uno, dos o tres átomos de hidrógeno por átomos de cloro (monocloramina NH_2Cl , dicloramina NHCl_2 y tricloruro de nitrógeno NCl_3 , respectivamente), así como todos los derivados clorados de compuestos orgánicos nitrogenados (Internacional Organization for Standarization, ISO, 1990).

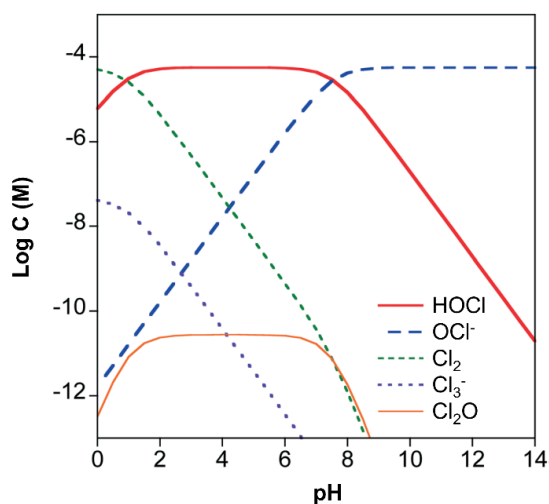


Figura I.2. Especies de cloro en función del pH (Remucal y Manley, 2016).

Mecanismo de acción

El cloro difunde en el interior de los microorganismos y actúa atacando componentes internos (Cho y col., 2010). Según Fernando y Othman (2006), los microorganismos o células pueden soportar cierta concentración de cloro en su interior hasta una concentración crítica, superada la cual, se ve afectada la viabilidad celular. En presencia de amoníaco, el cloro reacciona formando cloraminas que también tienen acción desinfectante, aunque en menor medida. Asimismo, puede reaccionar con otros iones inorgánicos de azufre, manganeso o hierro (Valero, 2017). El cloro puede atacar también la pared celular, reaccionando con los grupos amino de las proteínas y afectando a su estructura. Sin embargo, análisis estructurales realizados mediante microscopía electrónica han revelado que, tras la cloración, algunos microorganismos mantienen su estructura intacta (He y col., 2021).

Eficacia del cloro y valor CT

La eficacia del tratamiento de cloración depende del pH, la temperatura, las sales disueltas, el tiempo de exposición y la concentración de las diferentes formas de cloro. La eficacia del cloro como desinfectante puede deducirse mediante el valor CT (Erickson y Ortega, 2006). Este parámetro, según recoge el Manual de desinfectantes y oxidantes alternativos de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA, 1999), se calcula mediante el producto

de la concentración residual de cloro y el tiempo de exposición. Aunque puede emplearse con otros desinfectantes, se emplea con el cloro por excelencia. De hecho, existen tablas con los valores CT necesarios para reducir 2 ($CT_{99\%}$) o 3 ($CT_{99,9\%}$) unidades logarítmicas ciertos microorganismos, como *Escherichia coli* o *Giardia duodenalis*, bajo determinadas condiciones de temperatura y pH, facilitando la operatividad en las plantas potabilizadoras. De esta forma, este parámetro permite comparar la resistencia o vulnerabilidad de diferentes microorganismos a un mismo tratamiento y, de esta forma, se ha demostrado que el cloro es eficaz frente a un gran espectro de microorganismos (bacterias, virus, protozoos, etc.).

Ventajas y desventajas

El uso del cloro en tratamientos de desinfección presenta varias ventajas, entre ellas, el bajo coste del compuesto, su efectividad frente a numerosos patógenos de transmisión hídrica y su poder residual. Sin embargo, existen **microorganismos resistentes al cloro**, como (oo)quistes de protozoos (*Cryptosporidium parvum*, *Acanthamoeba* spp.), esporas vegetativas de bacterias (*Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*) y otras bacterias (Tabla I.1) que no se inactivan de forma efectiva mediante los tratamientos de cloración convencionales (Lanao y col., 2010; Remucal y Manley, 2016; Thomas, 2013). Otra desventaja de creciente preocupación es la **generación de subproductos potencialmente cancerígenos**, entre ellos los trihalometanos (Di Cesare y col., 2020), los cuales están limitados por normativa en aguas de consumo humano (RD 3/2023). Estas desventajas subrayan la necesidad de implementar varias etapas de desinfección, tratamientos alternativos y/o combinados con la cloración.

Tabla I.1. Microorganismos detectados en redes de distribución de agua y su nivel de resistencia al cloro. Tabla adaptada de He y col. (2023).

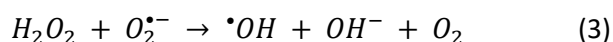
BACTERIA	RESISTENCIA A CLORO	REFERENCIA
<i>Pseudomonas peli</i>	$CT_{99,9\%} = 51,26 - 90,36 \text{ mgmin/L}$	Jia y col. (2015)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	$CT_{99,9\%} = 6,4 \text{ mgmin/L}$	Wang y col. (2019)
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	$CT_{99,9\%} = 50,2 \text{ mgmin/L}$	Wang y col. (2019)
<i>Bacillus cereus</i>	1 log tras 10 min con 1 mg/L NaClO	Zeng y col. (2020)
<i>Gordonia</i> spp.	3 log tras 240 min con 2,5 mg/L NaClO	Lu y col. (2020)
Enterovirus	$CT_{99,9\%} = 3,0 - 8,4 \text{ mgmin/L}$	Black y col. (2009)

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) se ha utilizado durante muchos años como desinfectante para tratamientos de agua potable, la descontaminación de dispositivos médicos y el control del crecimiento de biofilm, debido a su eficacia contra un amplio espectro de microorganismos y su razonable seguridad de manipulación. Además, se considera un tratamiento amigable con el medio ambiente ya que no produce subproductos tóxicos, en comparación con los tratamientos de cloración (Casini y col., 2017; Giannakis y col., 2016; Silva y Sagobal-Paz, 2021).

Mecanismo de acción

El H_2O_2 es una molécula con alto potencial de oxidación ($E^\circ = 1,76 \text{ V}$). En agua, se descompone liberando radicales hidroxilo ($\cdot OH$, $E^\circ = 2,73 \text{ V}$) y superóxido ($O_2^{\cdot -}$), tal y como indican las reacciones (2) y (3). Estas especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) tienen la capacidad de reaccionar con biomoléculas y penetrar en el interior de las células (Malato y col., 2009; Nogueira y col., 2005), lo que permite que el H_2O_2 , afecte a los microorganismos mediante acción interna y externa (Giannakis y col., 2016).



Por un lado, el daño interno está relacionado con la generación de $\cdot OH$ mediante las reacciones de Fenton intracelulares, el daño al ADN y afectación de la función mitocondrial (Giannakis y col., 2016; Woyda-Ploszczyca y col., 2011). Las reacciones de Fenton ocurren cuando el H_2O_2 se combina con iones ferrosos, principalmente, e iones férricos, los cuales se liberan al dañarse las estructuras celulares que lo contienen (moléculas como la ferritina o clústeres de Fe/S) por el ataque de ROS, H_2O_2 o exposición a la luz. Al reaccionar, se generan radicales $\cdot OH$ que, a su vez, puede generar otros ROS (Malato y col., 2009). Por otro lado, el mecanismo externo se basa en el ataque a la pared celular y el aumento de su permeabilidad, permitiendo un influjo adicional de H_2O_2 y daño posterior, además de un efecto perjudicial general en la viabilidad celular (Giannakis y col., 2016).

Diversos estudios han demostrado la efectividad del H_2O_2 frente a diferentes microorganismos (Casini y col., 2017). Además, este desinfectante presenta la ventaja de mantener cierto **poder residual** tras el tratamiento y **no formar subproductos tóxicos**. El principal inconveniente del H_2O_2 radica en la necesidad de **altas dosis y largos tiempos de exposición**. Estas elevadas dosis conllevan un riesgo **corrosivo** para los sistemas de distribución, por lo que no suele emplearse

como tratamiento en plantas potabilizadoras. Sin embargo, ha demostrado ser un desinfectante prometedor para aplicaciones directas en puntos de uso de agua (Silva y Sagobal y Paz, 2021).

Radiación ultravioleta y radiación solar

La radiación solar comprende un conjunto de radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol que abarcan desde la radiación infrarroja (IR) hasta la ultravioleta (UV), como se muestra en la Figura I.3. La radiación UV es la que mejores propiedades de desinfección tiene, siendo más efectiva cuanto mayor es su energía y, por tanto, menor su longitud de onda. El rango UV se divide a su vez en UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (200-280 nm), siendo este último el de mayor poder germicida. Actualmente, se utilizan lámparas de radiación UV en la regeneración de aguas residuales ya que no generan organoclorados e inactivan microorganismos.

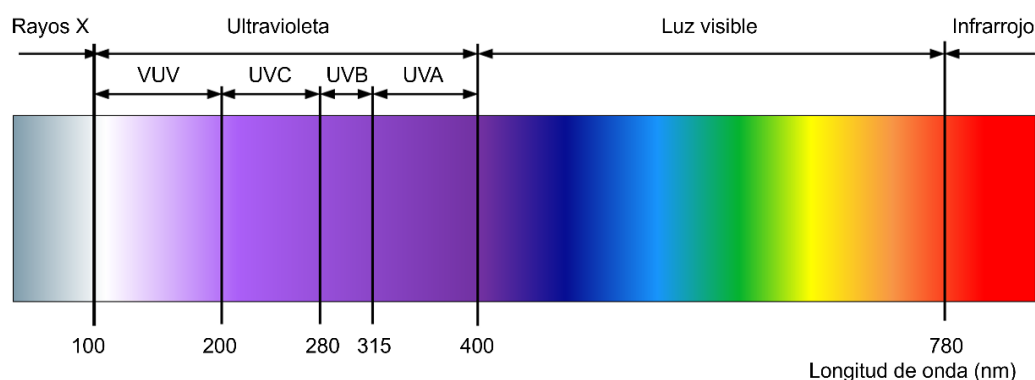


Figura I.3. Espectro de radiación ultravioleta-visible. Adaptado de Valero (2017).

Como alternativa a las lámparas UV, que implican un alto costo energético, la radiación solar está ganando interés como un tratamiento de desinfección natural, económico y accesible. Sin embargo, no todo el rango UV alcanza la superficie terrestre debido a la absorción natural por parte de la atmósfera, que filtra la radiación UV-C y parte de la UV-B. De esta manera, el rango de radiación UV que llega a la superficie terrestre abarca desde los 280 hasta los 800 nm. Aunque menos efectiva que la radiación UV-C, la radiación solar permite la desinfección gracias al su poder germicida y al aumento de temperatura (Pichel y col., 2019; Valero, 2017).

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la radiación solar implica acciones directas e indirectas dependientes de la longitud de onda. Por un lado, el rango UV-B actúa directamente sobre el ADN de las células, induciendo la formación de dímeros de timina (Giannakis y col., 2016), que pueden inhibir la replicación y transcripción normales del ADN (Dalrymple y col., 2010), impidiendo el

crecimiento y la replicación celular (Pichel y col., 2019). El rango UV-B también puede dañar a los microorganismos mediante mecanismos de fotosensibilización que generan especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, “reactive oxygen species”), las cuales, afectan a diferentes componentes celulares, incluyendo indirectamente el ADN. Por otro lado, la radiación UV-A sólo daña el ADN de forma indirecta a través de ROS; también puede aumentar la permeabilidad de la célula y afectar los compuestos vitales para el metabolismo y la homeostasis celular (Adan y col., 2018; Giannakis y col., 2016). De manera indirecta, la radiación UV-A también puede generar daño a través de reacciones foto-Fenton, que producen radicales hidroxilo al reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} (Giannakis y col., 2016; Valero, 2017).

La efectividad de este tratamiento de desinfección depende de la dosis absorbida por el microorganismo que, a su vez, está determinada por la intensidad de la radiación y el tiempo de exposición (EPA, 1999; Hijnen y col., 2006). Factores como la presencia de biofilm, la turbidez y el color del agua, la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos que absorben luz UV y la formación de agregados que dispersan la luz pueden disminuir su eficacia.

La radiación solar presenta la ventaja de **no generar compuestos organoclorados** (Di Cesare y col., 2020), sin embargo, **carece de poder residual**, por lo que suele emplearse en combinación con desinfectantes químicos para controlar la proliferación bacteriana y la formación de biofilms.

1.2.1. Procesos avanzados de oxidación

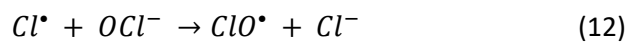
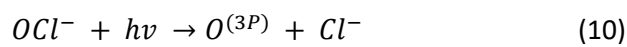
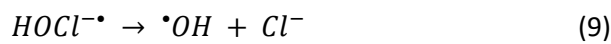
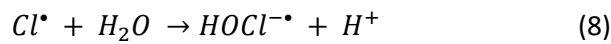
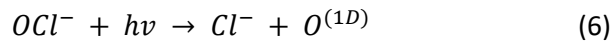
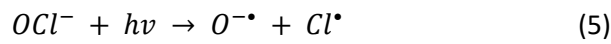
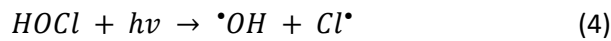
Los procesos avanzados de oxidación (PAO), también conocidos como procesos de oxidación avanzada (POA) en diversas fuentes bibliográficas (Lanao, 2012; Valero, 2017), son un conjunto de técnicas que generan especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas altamente reactivas que actúan de manera no selectiva, degradando compuestos e inactivando microorganismos (Mamane y col., 2007; Remucal y Manley, 2016). Los principales ROS incluyen $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} y H_2O_2 , destacándose el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) por su elevado poder oxidativo, su corta vida media y su capacidad para generar una cascada de reacciones que, a su vez, originan otros radicales libres (Khajouei y col., 2022).

Existen diversas técnicas capaces de generar estos ROS, como la combinación de cloro y radiación UV, la combinación de peróxido de hidrógeno y radiación UV, el sistema peroxona, la fotocatálisis o los procesos electro-Fenton, entre otros (Lanao, 2012; Remucal y Manley, 2016; Valero, 2017). Algunos de estos procesos pueden resultar costosos debido al uso de radiación UV. Como alternativa, en las últimas décadas han ganado interés los **PAO foto-inducidos**,

llevados a cabo mediante radiación solar, al **reducir** considerablemente los **costos** del tratamiento y convertirse en una opción de **energía limpia y más asequible** (Aguilar y col., 2018; Moreira y col., 2018). A continuación, se describen los procesos empleados en la presente Tesis Doctoral.

Combinación de cloro y radiación solar

La combinación de cloro y la radiación solar genera radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), ozono (O_3) y especies reactivas de cloro (RCS por sus siglas en inglés), como $\text{Cl}\cdot$, $\text{Cl}_2^{\cdot-}$ y $\text{ClO}\cdot$ (Remucal y Manley, 2016). Estas moléculas son muy reactivas y tienen un efecto biocida (Khajoueu y col., 2022). Este proceso, al igual que la subsecuente formación de especies reactivas oxidantes, es dependiente del pH y la longitud de onda, tal y como se muestra en las reacciones (4) a (13). Esto se debe a que las dos especies intercambiables de cloro (HOCl/OCl^-) tienen diferentes espectros de absorción UV-visible: el coeficiente de absorción máximo de HOCl se encuentra a 235 nm y el de OCl^- se encuentra a 292 nm (Figura I.4).



Los RCS también pueden colaborar en la inactivación microbiana, aunque no se tiene del todo claro hasta qué punto el $\text{Cl}\cdot$ reacciona más selectivamente que el $\cdot\text{OH}$. Además, se desconoce todavía si la producción de $\text{Cl}\cdot$ varía según la longitud de onda (Remucal y Manley, 2016).

De esta manera, la fotólisis del cloro combina múltiples mecanismos para inactivar patógenos: (1) la reacción directa de HOCl/OCl^- , (2) la fotólisis directa mediante la radiación UV, y (3) el

ataque de moléculas oxidantes (ROS, RCS y O_3) (Remucal y Manley, 2016), haciéndolo un tratamiento atractivo por su **efectividad** y por la acción del **cloro residual** (Khajouei y col., 2022).

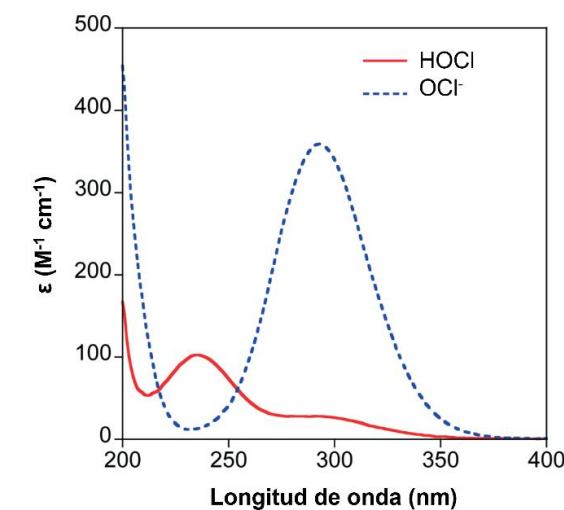


Figura I.4. Coeficientes de absorción molar (ϵ) de HOCl y OCl^- en función de la longitud de onda. Adaptado de Remucal y Manley (2016).

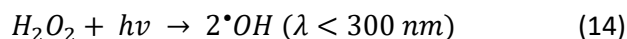
Se ha demostrado que la combinación de cloro y RS acelera de forma muy acentuada la inactivación de microorganismos muy resistentes al cloro como *Cryptosporidium* spp. (Zhou y col., 2014) y endosporas de *Bacillus subtilis* (Forsyth y col., 2013).

Combinación de peróxido de hidrógeno y radiación solar

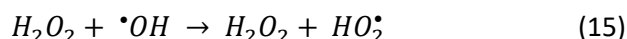
La combinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radiación solar (RS) es un tratamiento de desinfección que considera las ventajas del H_2O_2 , la RS y los procesos avanzados de oxidación (PAO). Además, el H_2O_2 tiene cierto poder residual y, al descomponerse finalmente en agua y oxígeno, **evita la necesidad de post-tratamientos** para eliminar fotocatalizadores o corregir el pH (García-Fernández y col., 2012). Esto ha llevado a su estudio para su empleo en pequeñas plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (Adeel y col., 2024), como tratamiento terciario (Michael y col., 20220) y para la regeneración de aguas (Agulló-Barceló y col., 2013).

El mecanismo de inactivación microbiana ha generado controversia, ya que aún no está completamente aclarado (Agulló-Barceló y col., 2013). No obstante, hay evidencia de que existe un efecto sinérgico entre ambos desinfectantes, lo que provoca la acumulación de daños: el daño externo e interno causado por H_2O_2 , el daño directo e indirecto de la RS, el daño producido por los radicales hidroxilo formados a través de la fotólisis de H_2O_2 – proceso que ocurre cuando el H_2O_2 absorbe luz UV a longitudes de onda inferiores a 300 nm, como se indica en la reacción

(14) – y las reacciones (foto)-Fenton (Giannakis y col., 2016; Malato y col., 2009; Mamane y col., 2007; Polo-López y col., 2011).



Si hay exceso de H_2O_2 , esta molécula también actúa como un secuestrador de $^{\bullet}OH$, tal y como indica la reacción (15), produciendo reacciones competitivas y disminuyendo la eficiencia de la degradación, estableciendo así un rango óptimo de concentración (Malato y col., 2009).



La mayoría de los estudios sobre la combinación de RS y H_2O_2 están enfocados en la degradación de contaminantes químicos, pero también se ha demostrado su capacidad para inactivar microorganismos. De hecho, este proceso ha demostrado ser efectivo y potenciar la desinfección, comparando con los tratamientos individuales, frente a *Escherichia coli* (Adeel y col., 2024), coliformes fecales totales, *Enterococcus* (Moreira y col., 2018), *Legionella jordanis* (Polo-López y col., 2017), *Pseudomonas aeruginosa* (Adeel y col., 2024), virus MS2 (Martínez-García y col., 2023), colífagos somáticos, bacteriófagos de ARN (Agulló-Barceló y col., 2013) y clamidiosporas de *Fusarium solani* (Sichel y col., 2009) y *Fusarium equiseti* (Polo-López y col., 2011).

2. CARACTERÍSTICAS DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE

2.1. HÁBITAT Y CICLO DE VIDA

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos ubicuos que se encuentran ampliamente distribuidos en suelo, aire y, especialmente, agua, donde puede hallarse una gran variedad de estas. Poseen capacidad de vida libre, es decir, no son parásitos obligados, y pueden habitar diversos ambientes, adaptándose a distintas condiciones de temperatura, osmolaridad y pH (Cateau y col., 2014).

Las AVL son un grupo heterogéneo de microorganismos y la mayoría de ellos desarrollan dos estadios diferentes: el trofozoíto y el quiste. El primero corresponde a la fase metabólicamente activa, mientras que el segundo comprende la forma latente o de resistencia. Este proceso de enquistamiento involucra la producción de una pared gruesa y robusta, que les confiere una enorme resistencia a condiciones adversas y les mantiene latentes hasta que las condiciones se tornan favorables (Cateau y col., 2014; Garajová y col., 2019; Rodríguez-Zaragoza, 1994), pudiendo resistir hasta 20 años en este estadio (Sriram y col., 2008).

La capacidad de enquistarse les permite sobrevivir a tratamientos de agua, incluidos los procesos convencionales de estaciones depuradoras de aguas residuales, estaciones regeneradoras de aguas residuales y estaciones de tratamiento de aguas potables (Corsaro y col., 2010; Fernández-Cassi y col., 2016; Loret y Greub, 2010; Magnet y col., 2013; Marín y col., 2014; Mosteo y col., 2013). Esto les posibilita diseminarse a través de sistemas acuáticos, tanto naturales como artificiales (Cateau y col., 2014; Thomas y col., 2010). Precisamente, se ha demostrado su presencia en ríos, reservas, aguas subterráneas, lagos, aguas termales, piscinas, grifos, sistemas de distribución, torres de refrigeración y sistemas acuáticos hospitalarios, entre otros (Di Filippo y col., 2015; Fernández, 2014; Pagnier y col., 2015; Tsvetkova y col., 2004), donde suelen encontrarse formando parte de biofilms (Wingender y Flemming, 2011).

Hasta la fecha, se han descrito como AVL infecciosas para humanos a *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Vermamoeba vermiformis*, *Balamuthia mandrillaris*, *Paravahlkampfia francinae*, *Allovahlkampfia spelaea* y *Sappinia pedata* (Gelman y col., 2001; Plutzer y Karanis, 2016; Qvarnstrom y col., 2009; Tolba y col., 2016; Visvesvara y col., 2009). Algunas especies de *Acanthamoeba* se han identificado principalmente como causantes de queratitis, aunque también pueden ocasionar encefalitis amebiana granulomatosa e infecciones dérmicas y pulmonares. *Vermamoeba vermiformis* también es agente causante de queratitis (Delafont y col., 2018), mientras que *B. mandrillaris* puede causar encefalitis amebiana granulomatosa,

además de infecciones nasofaríngeas y cutáneas (Visvesvara y col., 2007). *Naegleria fowleri* es conocida por provocar meningoencefalitis amebiana primaria, una infección cerebral mortal (Plutzer y Karanis, 2016; Visvesvara y col., 2007). Por otro lado, *A. spelaea*, *P. francinae* y *S. pedata*, se han relacionado con patologías humanas en ocasiones puntuales: queratitis amebiana (Tolba y col., 2016), meningoencefalitis (Visvesvara y col., 2009) y encefalitis (Gelman y col., 2001), respectivamente, lo que muestra el potencial de estos protozoos para convertirse en patógenos oportunistas para los humanos (Qvarnstrom y col., 2009; Visvesvara y col., 2007).

2.2. INTERACCIÓN CON OTROS MICROORGANISMOS

Las AVL contribuyen al control de la población microbiana como depredadores de bacterias, hongos y algas (Rodríguez-Zaragoza, 1994). De esta manera, juegan roles ecológicos importantes al influir en la dinámica y diversidad poblacional de los ecosistemas y al contribuir en el reciclado de nutrientes como nitrógeno y carbono, ya que descomponen materia orgánica, biofilms y otros microorganismos, a la vez que sirven de fuente de alimento para organismos en niveles tróficos superiores, como nematodos (García y col., 2013; Lee y Park, 2023). Sin embargo, algunos microorganismos pueden sobrevivir a la ingestión por amebas (Greub y Raoult, 2004) y, cada vez más, se tiene consciencia de que las relaciones entre estos y la ameba hospedadora pueden llegar a ser muy complejas y variadas. Diferentes especies bacterianas han desarrollado estrategias evolutivas para evitar la digestión por amebas y permanecer protegidas en su interior ante condiciones ambientales adversas (Delumeau y col., 2023). *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Chlamidia* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. y cianobacterias tóxicas son algunas de las especies y géneros que han demostrado esta habilidad (Goñi y col., 2014; Greub y Raoult, 2004).

Otras bacterias han desarrollado la capacidad de reproducirse en el interior de amebas, como *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori* (Rayamajhee y col., 2022), y algunas han llegado incluso a transformar e invertir la relación depredador-presa en agente infeccioso (la bacteria)-agente infectado (la ameba). Tal es el caso de *Legionella*, que, cada vez y con mayor certeza, se cree que utiliza a las amebas, especialmente *Acanthamoeba*, para reproducirse y proliferar en un ambiente seguro, para posteriormente lisar la ameba y colonizar los sistemas acuáticos donde se encuentre (Loret y Greub, 2010).

Se ha cuestionado en la bibliografía el término más correcto para denominar a estas bacterias. Büchner y col. (1953) emplean el término “bacterias endosimbiontes”, refiriéndose a

organismos que habitan en el interior de otros de forma simbiótica, sin embargo, este término ha generado reticencias debido a que la simbiosis implica un beneficio mutuo y no todas las bacterias presentes en el interior de las amebas se relacionan de este modo. Greub y Raoult (2004) hablan de “bacterias resistentes a las amebas”, pero sus siglas “BRA” (ARB en inglés, “amoeba resistant bacteria”) son las mismas que las empleadas (más) amplia y generalmente para denominar a las bacterias resistentes a antibióticos, BRA (ARB en inglés, “antibiotic resistant bacteria”), lo cual puede generar confusión. En 2014, Scheid propuso la utilización del término “endocitobionte” para denominar de forma genérica a los microorganismos intracelulares asociados con AVL; de esta manera, no se hace referencia al tipo de relación (parasitismo, foresia¹, comensalismo² o mutualismo³) entre el microorganismo y la ameba, la cual además puede verse modificada en función de condiciones ambientales. De esta forma, en la presente Tesis Doctoral se emplea el término “bacteria endocitobionte” para toda aquella bacteria que se encuentre en el interior de amebas, ya sea de forma transitoria o permanente y sea cual sea su relación ecológica.

La capacidad de diferentes microorganismos, especialmente bacterias, para sobrevivir en el interior de las amebas de vida libre (AVL) y la gran resistencia de estas a condiciones adversas y desinfectantes, convierten a las AVL en reservorio, vector y protector de patógenos (Greub y Raoult, 2004). Además, durante este periodo intracelular, se ha visto que las bacterias endocitobiontes (BE) pueden experimentar cambios fenotípicos que potencian sus propiedades invasivas, así como incremento de su patogenicidad, virulencia y resistencia a antibióticos (Cardas y col., 2012); de hecho, se ha observado que la permanencia en el interior de las amebas favorece la retención de factores de virulencia que confieren ventajas durante la infección a otros “hospedadores” (Bertelli y Greub, 2012). Es posible que esto se deba a las adaptaciones que han tenido que desarrollar para sobrevivir la fagocitosis o las interacciones con otras bacterias en el interior de la ameba. En este sentido, algunos estudios han denominado este rol de las amebas como una “cuna evolutiva” (o “evolutionary crib” en inglés), al considerarlas un ambiente o “ecosistema” que potencia la adaptación, adquisición (y pérdida) de diferentes atributos (Greub y Raoult, 2004), y como un “campo de entrenamiento” para desarrollar

¹ Foresia: relación ecológica en la que una especie transporta a otra favoreciendo su diseminación.

² Comensalismo: relación entre individuos de diferentes especies en la que uno se ve beneficiado y el otro no perjudicado ni beneficiado.

³ Mutualismo: relación entre individuos de diferentes especies en la que ambas se benefician. La simbiosis, en sentido estricto, es un tipo de mutualismo en el que la relación es indispensable para la supervivencia de los individuos; sin embargo, frecuentemente mutualismo y simbiosis se emplean como sinónimos.

estrategias de evasión inmunológica, al adquirir la capacidad de evadir la digestión por macrófagos (Siddiqui y Khan, 2012).

2.3. LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE EN EL CICLO URBANO DEL AGUA

Las regulaciones citadas en el Apartado I.3.1. juegan un papel importante al establecer los requisitos que ha de cumplir el agua en función del uso que se le vaya a dar. Sin embargo, **hay microorganismos potencialmente patógenos que son capaces de sobrevivir a los diferentes procesos a los que se somete el agua y que no suelen monitorizarse de forma rutinaria** (Benito y col., 2020); tal es el caso de las amebas de vida libre (AVL) que, gracias a su estadio de quiste, tienen una gran resistencia a estos tratamientos (Garajová y col., 2019).

Las AVL, además de ser patógenos oportunistas, pueden actuar como **caballos de Troya**, protegiendo bacterias endocitobiontes (BE) y otros microorganismos potencialmente patógenos a través de los diferentes tratamientos de agua (depuración, regeneración, potabilización, desalación) y permitiendo que pasen inadvertidos a través de los controles de calidad microbiológica del agua. De esta forma, las AVL y sus BE pueden incorporarse al ciclo urbano del agua y colonizar grifos domésticos, piscinas, hospitales, fuentes, torres de refrigeración o humidificadores (Di Filippo y col., 2015; Fernández, 2014; Nisar y col., 2022). Estas BE pueden salir o lisar la ameba y convertir estos puntos en focos de infección, suponiendo un riesgo para la salud pública (Garajová y col., 2019). De hecho, se cree que la rápida recolonización de sistemas acuáticos de refrigeración, domésticos u hospitalarios por *Legionella*, dispositivos relacionados con brotes de legionelosis, se debe a la protección por AVL (Cateau y col., 2014; Corsaro y col., 2010; Greub y Raoult, 2004; Loret y Greub, 2010; Nisar y col., 2022). Esta bacteria merece una mención aparte.

Legionella spp. es el género bacteriano más estudiado como BE de *Acanthamoeba*. Esta bacteria aprovecha el interior de la ameba, donde está a salvo de procesos de desinfección y condiciones adversas, para reproducirse y, posteriormente, lisar la AVL y colonizar el hábitat en el que se encuentre (Loret y Greub, 2010). Precisamente, se ha detectado su presencia (y la de otras BE potencialmente patógenas) en el interior de AVL aisladas de piscinas y la red hídrica de hospitales (Fernández, 2014; Muchesa y col. 2018). Paralelamente, el incremento de las infecciones por *Legionella* y, especialmente, *Legionella pneumophila* ligado a dispositivos que generan aerosoles (Declerk y col., 2007; Samuelsson y col., 2023) ha llegado hasta tal punto que se ha establecido un Real Decreto (RD 487/2022) específico para prevenir y controlar esta infección. Además, el nuevo Real Decreto por el que se establecen los criterios de calidad del

agua de consumo (RD 3/2023) ha añadido controles de *Legionella* en grifos de edificios públicos, así como en hospitales y centros sanitarios (donde también se incluyen controles de *Pseudomonas aeruginosa*, otra BE común). Sin embargo, en ninguno de estos Reales Decretos se incluye la detección de AVL y, sólo en el RD 487/2022, se menciona que la presencia de esta bacteria puede estar relacionada, entre otros, con la presencia de amebas.

Cabe añadir que, las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) son, particularmente, un hábitat ideal para las AVL y contribuyen a la diseminación, tanto de estas como de bacterias potencialmente patógenas. Esta situación resulta preocupante debido a que se está incrementando la regeneración de agua para reutilización en actividades agrícolas y recreativas (Mosteo y col., 2013), lo cual puede convertir a las AVL y sus BE en contaminantes recalcitrantes en el ciclo del agua.

3. LOS ANTIBIÓTICOS Y LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

Los **antimicrobianos** son compuestos químicos capaces de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos; pueden actuar sobre bacterias, hongos, protozoos, virus y helmintos. Dentro de este grupo, aquellos cuya diana son las bacterias se denominan agentes **antibacterianos**. Los antimicrobianos pueden ser producidos de manera **natural** por microorganismos (como la penicilina, producido por hongos, o la tetraciclina, por bacterias), de forma **semisintética** (como la amoxicilina, derivada de la penicilina) o **sintética** (como las fluoroquinolonas). El término “**antibiótico**” fue acuñado por **Selman Waksman**, descubridor de la estreptomycin, para referirse a los compuestos naturales de origen microbiano. No obstante, este término se emplea comúnmente como sinónimo de “antimicrobiano”, abarcando tanto compuestos naturales como sintéticos (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2011). En la presente Tesis Doctoral, el término “**antibiótico**” se emplea para designar a los agentes antimicrobianos, ya sean de origen natural, semisintético o sintético, con actividad antibacteriana.

3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos pueden clasificarse según su mecanismo de acción, el cual depende de su estructura. Los antibióticos **bactericidas** son letales para las bacterias, mientras que los **bacteriostáticos** inhiben el crecimiento bacteriano; en el caso de estos últimos, al cesar la actividad antibiótica, las bacterias son capaces de reanudar su actividad. La capacidad bactericida o bacteriostática también depende de la concentración antibiótica y del microorganismo diana. Según su mecanismo de acción, los antibióticos se dividen en las siguientes clases:

- a) Inhibición de la **síntesis de la pared celular**, la cual es necesaria para la mantener la integridad anatómica y fisiológica de la bacteria. En general, son antibióticos bactericidas. La familia más conocida es la de betalactámicos, que inhiben la síntesis de peptidoglucano, el principal componente de la pared bacteriana, al bloquear las llamadas proteínas de unión a penicilina (PBP), las cuales intervienen en el proceso de formación del peptidoglucano. Al interferir en el equilibrio entre la síntesis e hidrólisis de este compuesto, se activa un sistema enzimático lítico (las autolisinas) que acaba provocando la muerte celular. Otros antibióticos impiden la síntesis de la pared celular

- mediante la inhibición de enzimas implicadas en la síntesis de los precursores del peptidoglucano o interrumpiendo el transporte de estos precursores al exterior celular.
- b) Alteración de la **membrana plasmática**, provocando la salida de elementos esenciales o la entrada de otros potencialmente tóxicos. En general, son bactericidas. Un ejemplo sería la polimixina B, que altera la membrana al unirse a los fosfolípidos, induciendo cambios de permeabilidad y pérdida de metabolitos importantes.
 - c) Inhibición de la **síntesis de ácidos nucleicos**, interfiriendo en los procesos de replicación (como las quinolonas) y transcripción de ADN (como las rifamicinas) o causando daño directo al ADN (como los nitroimidazoles y nitrofuranos). En general son compuestos bactericidas.
 - d) Inhibición de la **síntesis de proteínas**. Estos antibióticos bloquean el proceso de síntesis proteica, bien al inicio, provocando errores en la lectura del ARN mensajero y la producción de proteínas anómalas (como los aminoglucósidos), otros interfieren durante la fijación del ARN de transferencia que porta el aminoácido a unir (como las tetraciclinas) o durante la elongación de la cadena polipeptídica (como los anfenicoles y macrólidos). Generalmente, son bacteriostáticos, excepto en el caso de los aminoglucósidos, que son bactericidas.
 - e) Inhibición de la **síntesis de metabolitos esenciales**, como el ácido para-aminobenzoico (PABA). Se trata de un sustrato necesario para la síntesis de ácido fólico, el cual, es crucial para sintetizar las bases nitrogenadas que forman los ácidos nucleicos que, a su vez, son esenciales para el crecimiento del microorganismo. Ejemplos de este tipo de antibióticos son las sulfonamidas y diaminopirimidinas, que inhiben la actividad enzimática de forma competitiva al poseer semejanza estructural al PABA.

En la Tabla I.2 se recogen los principales grupos de antibióticos clasificados según su mecanismo de acción y estructura química. En ocasiones, se incluyen los inhibidores de betalactamasas; la mayoría de estos compuestos no tienen una acción antibacteriana intrínseca, sino que se unen a ciertas betalactamasas, permitiendo que los antibióticos betalactámicos mantengan su eficacia (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Pasteran y col., 2021).

Tabla 1.2. Principales grupos de antimicrobianos y representantes de estos. En negrita se muestran los empleados en la presente Tesis Doctoral. Adaptado de Calvo y Martínez-Martínez (2009).

MECANISMO DE ACCIÓN	GRUPO	SUBGRUPO	ANTIBIÓTICOS REPRESENTATIVOS
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	Bacitracina		Bacitracina
	Betalactámicos	Penicilinas	Penicilina, oxacilina, ampicilina, piperacilina
		Cefalosporinas	1ª generación: cefalotina 2ª generación: cefoxitina 3ª generación: ceftriaxona, ceftazidima 4ª generación: cefepima
			Imipenem, meropenem
		Carbapenems	
		Monobactámicos	Aztreonam
Alteración de la membrana citoplasmática	Glucopéptidos		Vancomicina
	Polimixinas		Polimixina
Inhibición de la síntesis proteica	Ácido fusídico		Ácido fusídico
	Aminoglucósidos		Gentamicina, kanamicina, estreptomina
	Anfenicoles		Cloranfenicol
	Estreptograminas		Quinupristina-Dalfopristina
	Lincosamidas		Clindamicina
	Macrólidos		14 átomos de C: eritromicina 15 átomos de C: azitromicina 16 átomos de C: espiramicina
	Mupirocina		Mupirocina
	Oxazolidinonas		Linezolid
	Pleuromutilinas		Tiamulina
	Tetraciclinas		Tetraciclina, minociclina
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas		1ª generación: ácido nalidíxico 2ª generación: ciprofloxacino 3ª generación: levofloxacino 4ª generación: moxifloxacino
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos		Rifamicinas	Rifampicina
		Sulfonamidas	Sulfametoxazol
Inhibidores de betalactamasas	Diaminopirimidinas		Trimetoprim
			Ácido clavulánico

C: carbono.

3.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Se denomina “**resistencia**” a la capacidad de un microorganismo para no verse afectado por los efectos de un antibiótico. Existen diferentes mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia antimicrobiana (Darby y col., 2023; Gimeno y Ortega, 2005; Ince y Hooper, 2003), los cuales, se describen a continuación y se muestran esquemáticamente en la Figura I.5:

- a) **Reducción de la concentración del antimicrobiano en el interior** de la bacteria: Esto puede lograrse al **reducir su entrada o alterar su permeabilidad** (cambios en determinadas porinas de membrana que impiden el paso del antibiótico), forzar su salida mediante **expulsión activa** del antibiótico a través de sistemas bombas de eflujo o al **alterar el mecanismo de transporte específico** (por ejemplo, el antibiótico cicloserina aprovecha el sistema de transporte de la valina o de la glicina de *Escherichia coli* para entrar en la bacteria y actuar sobre ella; sin embargo, cepas incapaces de transportar estos aminoácidos son resistentes al antibiótico).
- b) **Inactivación enzimática del antibiótico**: Las bacterias pueden sintetizar enzimas que alteran la estructura del antibiótico (como las enzimas modificadoras de aminoglucósidos o la enzima cloranfenicol acetiltransferasa) o que lo hidrolizan (como las betalactamasas o las enzimas que inactivan las tetraciclinas), anulando así su función.
- c) **Modificación de la diana** para disminuir la afinidad del antibiótico: Esto puede ocurrir bien por **mutaciones en el gen codificante** (como las mutaciones en las topoisomerasas que son diana de quinolonas o en las proteínas de unión a penicilinas, PBP, para disminuir la unión de betalactámicos), **o por modificaciones enzimáticas del sitio de unión** (como las causadas por metilasas de ARN, que producen cambios en el ribosoma y disminuyen su afinidad por macrólidos).
- d) **Estrategias de “bypass” o circunvalación**: Las bacterias pueden sintetizar una **proteína análoga a la original** pero **resistente** o con menor afinidad por el antibiótico (como la producción de PBP2a, proteínas homólogas a las PBP originales pero con menor afinidad al betalactámico meticilina, proporcionando resistencia a este antibiótico), **sobreproducir la proteína diana** para mitigar el impacto del antibiótico (como la sobreproducción de dihidrofolato sintasa y dihidrofolato reductasa, otorgando resistencia a sulfametoxazol y trimetoprim, respectivamente) o **reducir su nivel de expresión** (como las alteraciones que reducen la cantidad de topoisomerasas ParE, originando mayor resistencia a quinolonas).
- e) **Protección de la diana** para evitar la unión del antibiótico (por ejemplo, la producción de proteínas Qnr, que protegen a las topoisomerasas de la unión a quinolonas, o de

proteínas FusB, que promueven la disociación del ácido fusídico y el factor de elongación de proteínas).

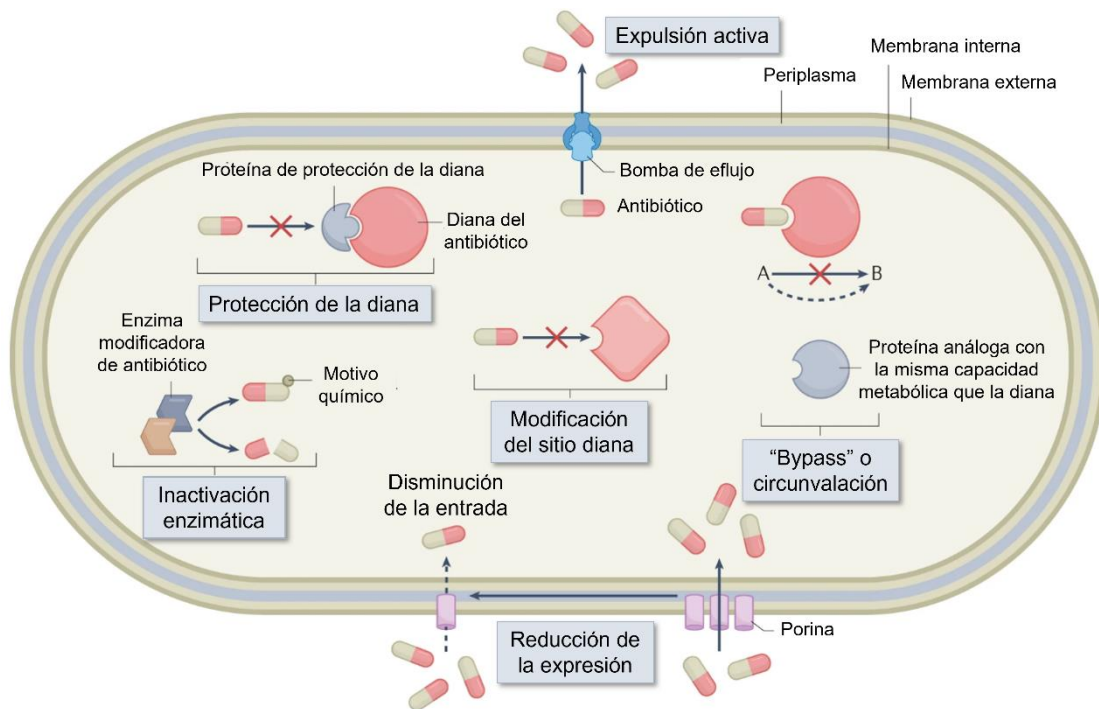


Figura I.5. Esquema de los mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos. Adaptado de Darby y col. (2023).

Origen de las resistencias

Algunas bacterias tienen una resistencia **natural o intrínseca** a ciertos antibióticos, lo que implica que no se vean afectadas por estos compuestos, mientras que otras, pueden ser inicialmente sensibles pero desarrollar resistencia, la denominada resistencia **adquirida**. Un ejemplo de resistencia intrínseca se observa en las bacterias gram negativas, caracterizadas por tener una doble membrana celular que las hace relativamente impermeables y, por ende, son intrínsecamente resistentes a ciertos antibióticos eficaces frente a bacterias gram positivas (Darby y col., 2023; OMS, 2011). Las cepas productoras de antibióticos también poseen mecanismos intrínsecos de resistencia para protegerse de sus propios compuestos antibacterianos (Ogawara, 2019).

Por otro lado, la resistencia adquirida puede surgir por **mutaciones en el ADN**, cambios genéticos naturales consecuencia de un error en la lectura y replicación del ADN que pueden afectar a cualquier gen. En presencia de concentraciones subinhibitorias de antibióticos, las bacterias mutantes resistentes son seleccionadas al eliminarse la población susceptible y

favorecerse su propagación. Estas cepas resistentes, al reproducirse, diseminan su resistencia mediante **transferencia genética vertical**.

Una bacteria sensible también puede volverse resistente por la **adquisición de genes de resistencia a antibióticos (GRA)** de otra bacteria ya resistente mediante **transferencia genética horizontal (TGH)**; de hecho, se considera el mecanismo más común. En este contexto, se habla de **resistencia cruzada** cuando un único gen confiere resistencia a dos o más antibióticos que suelen pertenecer a la misma clase. Por otro lado, se habla de **co-resistencia** cuando diferentes GRA, que confieren resistencia a diferentes clases de antibióticos, se encuentran juntos en el ADN bacteriano y se transfieren simultáneamente (OMS, 2011; Ndagi y col., 2020).

Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos

La resistencia a un determinado antibiótico puede deberse a diferentes mecanismos que, a su vez, pueden estar presentes simultáneamente o no en la bacteria resistente. Por ejemplo, los aminoglucósidos son una familia de antibióticos que se unen al sitio A del ARN ribosómico (ARNr) 16 S, que conforma la subunidad 30 S del ribosoma, el cual reconoce los aminoacil-ARN de transferencia (ARNt), inhibiendo la síntesis de proteínas y provocando consecuentemente la muerte de la bacteria. La resistencia a estos antibióticos puede deberse a diferentes mecanismos: (1) la modificación enzimática e inactivación de los aminoglucósidos, (2) la disminución de la concentración en el interior de la célula, bien por disminuir la permeabilidad de la membrana o por transporte activo mediado por bombas de eflujo y (3) por modificaciones en la diana que interfieren con la unión de los aminoglucósidos (Shaw y col., 1993). En este último caso se han detectado tanto mutaciones en el propio ARNr 16S en *Mycobacterium tuberculosis*, como metilaciones mediadas por ARNr metiltransferasas (Doi y col., 2016).

El mecanismo de resistencia más común a aminoglucósidos se debe a la inactivación enzimática mediante enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs), que pueden ser de tres tipos: acetiltransferasas (AAC), nucleotidiltransferasas o adenililtransferasas (ANT), y fosfotransferasas (APH). Estas suelen adquirirse mediante genes presentes en plásmidos y/o asociados a transposones, que ayudan a la rápida diseminación de resistencias entre especies (Shaw y col., 1993). Estas enzimas se codifican en función del tipo de modificación enzimática (AAC, ANT, APH), el sitio de modificación (1, 3, 6, 9, 2', 3', 4', 6', 2'', 3''), los perfiles de resistencia que otorgan (I, II, III, IV, V, etc.) y la estructura de la proteína (a, b, c, etc.); de tal forma que, las enzimas AAC(6')-Ia y la AAC(6')-Ib son dos proteínas únicas que confieren perfil de resistencia idénticos.

La nomenclatura de los genes que codifican estas enzimas: *aac(6')*-Ia y *aac(6')*-Ib son genes únicos que codifican dos proteínas con el mismo perfil de resistencia (Shaw y col., 1993).

3.3. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL MEDIADA POR ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES: LOS INTEGRONES

La captura, acumulación y diseminación de genes de resistencia a antibióticos (GRA) se debe en gran medida a los **elementos genéticos móviles** (EGM), un término empleado para referirse a los elementos que promueven la **movilidad de ADN**, tanto **intracelular** (del cromosoma a un plásmido o entre plásmidos) como **intercelular**. La **transferencia genética horizontal** (TGH) es el mecanismo de diseminación y difusión de GRA más importante entre cepas bacterianas. La adquisición de EGM de manera intercelular ocurre de un donador a un receptor y puede producirse por tres mecanismos de TGH:

- a) **Transformación**: incorporación de ADN extracelular desnudo que proviene de la lisis y muerte de otras bacterias.
- b) **Conjugación**: transmisión directa de ADN de una bacteria donante a una receptora mediante contacto directo o una conexión que las una, como el pili conjugativo.
- c) **Transducción**: mediante un virus bacteriano o bacteriófago que actúa como vector. Ciertos virus (virus lisogénicos), cuando entran en el interior de la célula, se integran en el propio ADN de la bacteria y, al generarse copias, pueden “llevarse” material genético bacteriano también y transferirlo a las bacterias que infectan posteriormente.

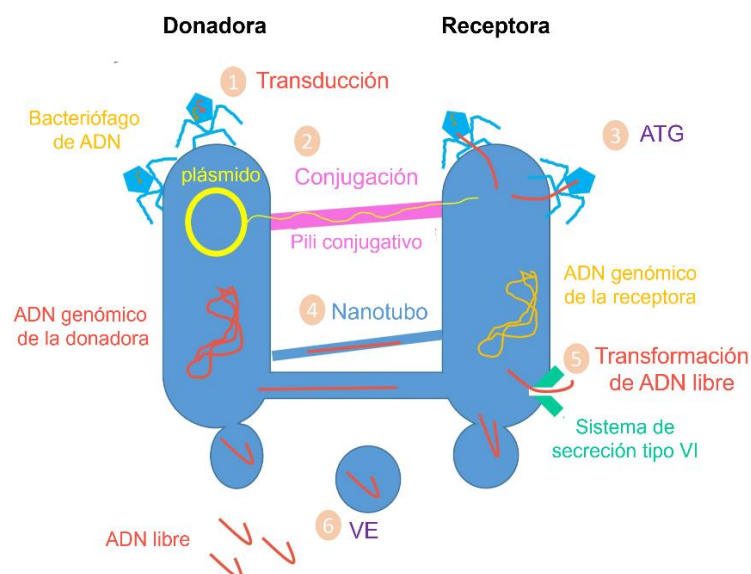


Figura I.6. Mecanismos de transferencia genética horizontal: transducción, conjugación, agentes de transferencia genética (ATG), nanotubos, transformación y vesículas extracelulares (VE) o exosomas. Figura adaptada de Emamalipour y col. (2020).

Recientemente, también se ha detectado intercambio genético horizontal mediante nanotubos y vesículas extracelulares, también llamadas exosomas (Emamalipour y col., 2020; Partridge y col., 2018). En la Figura I.6 se muestran estos mecanismos de transferencia.

El vehículo principal en la TGH son los **plásmidos**: secuencias circulares de ADN extra-cromosómico que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico (y por tanto son transmisibles verticalmente) y, generalmente, confieren ventajas al huésped, aunque su mantenimiento también supone un mayor gasto energético. Las **islas genómicas (IG)** son otro tipo de EGM que consisten en una región del cromosoma bacteriano adquirida por transferencia horizontal. Pueden estar compuestas por cientos de genes y suelen clasificarse según el fenotipo que otorgan (islas de resistencia o de patogenicidad, según codifiquen genes de resistencia o factores de virulencia, respectivamente). Estas IG pueden agrupar también a otros elementos conjugativos (integrativos, movilizables y transferibles mediante fagos). No obstante, también existen otros elementos genéticos móviles intracelulares, como las **secuencias de inserción (SI)**, los **transposones (Tn)** o los **integrones (Int)**: pequeños segmentos de ADN que pueden trasladarse, escindirse e integrarse de una región del cromosoma a otra, o a un plásmido, de forma autónoma (Partridge y col., 2018). En la Figura I.7 se recogen este conjunto de EGM.

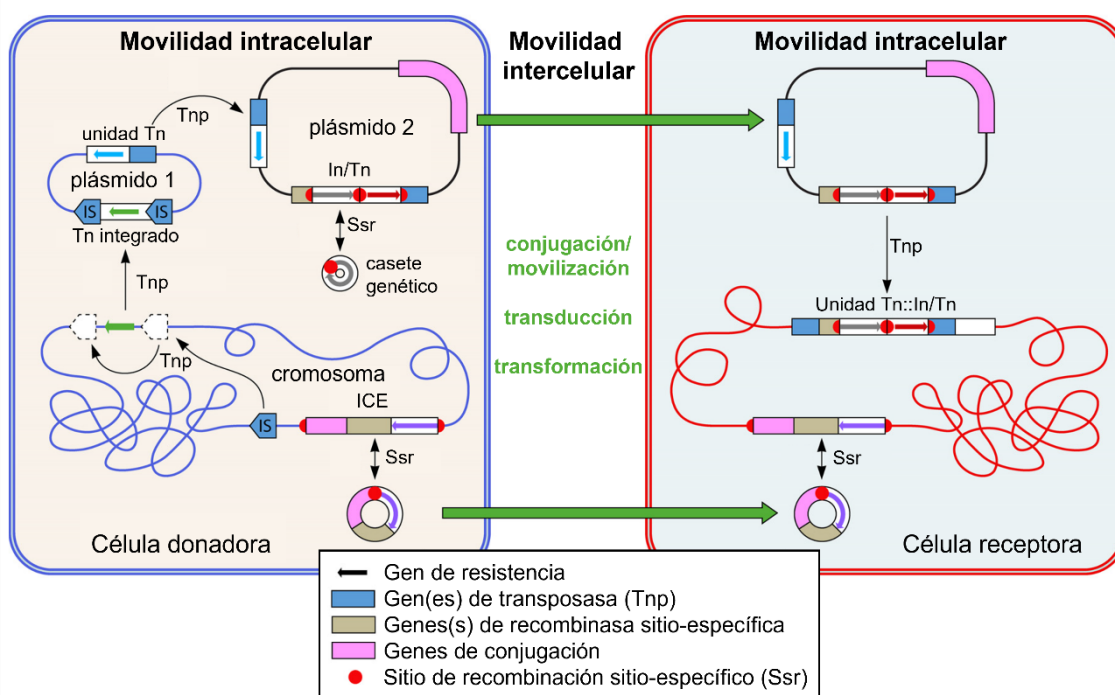


Figura I.7. Ejemplos de elementos genéticos móviles (secuencias de inserción, IS, transposón, Tn, integrón, In, plásmido, elemento integrativo conjugativo, ICE), procesos involucrados en la movilidad intracelular (flechas negras), los cuales pueden estar mediados por una transposasa (Tnp) o por una recombinasa sitio específica (Ssr), y procesos involucrados en la transferencia intercelular (flechas verdes) de genes de resistencia a antibióticos. Adaptado de Partridge y col. (2018).

Los integrones

Los integrones son EGM que facilitan la captura, expresión y diseminación de GRA (y otros genes) entre bacterias. Un integron generalmente se caracteriza por la presencia de un gen que codifica una integrasa (*intI*), un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor (P_C). La integrasa cataliza la recombinación entre los sitios *attI* del integron y el *attC* de casetes genéticos, permitiendo la inserción o escisión de estos. Los genes insertados se expresan gracias al promotor del integrón.

Los casetes genéticos son pequeños fragmentos de ADN (de 0,5-1 kilobases) móviles, consisten en un único gen (ocasionalmente dos) y un sitio de recombinación (*attC*), existen en forma circular libre y no se replican. Los casetes genéticos se integran en regiones variables de los integrones, entre los sitios de recombinación, y suelen codificar GRA. La acumulación de varios casetes en un integrón conforma un “array” de casetes que puede conferir multirresistencia, convirtiendo a estos EGM en reservorios genéticos (que pueden llegar a contener cientos de genes) que facilitan la adaptación a diferentes presiones selectivas y promueven su diseminación entre bacterias. Además, la presencia de múltiples copias de integrones localizados en diferentes partes del genoma, facilita la recombinación homóloga y el intercambio de secuencias entre estos sitios de recombinación, contribuyendo a la variabilidad genética y adaptación bacteriana (Deng y col., 2015; Gillings y col., 2015; Partridge y col., 2018). En la Figura I.8 se muestra la estructura de un integrón y de inserción de los casetes genéticos.

Los integrones se clasifican en varias clases según la secuencia de aminoácidos de sus integrasas. Los integrones de clase 1 son los más frecuentes en muestras clínicas. Poseen unas regiones conservadas con los genes *qacEΔ1* y *sul1*, que codifican resistencia a sales de amonio cuaternario y a sulfonamidas, respectivamente. Esta clase de integrones se ha asociado con una variedad de casetes genéticos (Deng y col., 2015; Partridge y col., 2018). Los integrones de clase 2 presentan una menor diversidad de casetes genéticos, lo cual, se ha asociado a la presencia de un codón stop interno en la secuencia, que provoca que la integrasa sea inactiva y se restrinja su capacidad de adquirir nuevos casetes genéticos. Si bien es verdad que se han detectado integrones de clase 2 funcionales, que carecen de dicho codón de stop (Gillings, 2014). En cuanto a los integrones de clase 3, detectados tanto en bacterias de origen clínico como ambiental, también se ha observado una menor diversidad de casetes, atribuida a una menor actividad de la integrasa (Correia y col., 2003; Gillings, 2014; Tchuente y col., 2016). Por otro lado, los integrones de clase 4 suelen ser cromosómicos y, los integrones de clase 5 en adelante, presentan una prevalencia

mundial muy baja y han sido poco estudiados hasta la fecha (Deng y col., 2015; Partridge y col., 2018).

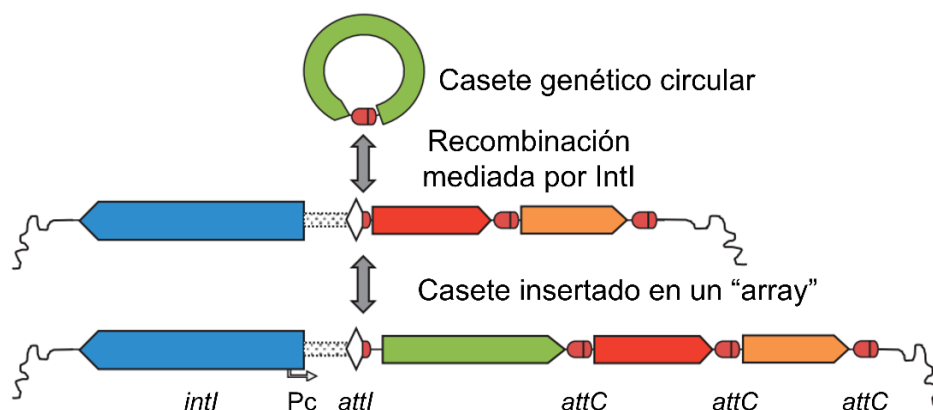


Figura I.8. Estructura de un integrón e inserción de un casete genético. Adaptado de Gillings y col. (2015).

Bacterias multirresistentes y superbacterias

Las interacciones entre varios tipos de EGM y GRA sustentan la rápida evolución de bacterias resistentes a múltiples antibióticos o bacterias **multirresistentes** (Partridge y col., 2018). Aunque hay disparidad de opiniones a la hora de definir este término (Mohanta y Goel, 2014; Servais y Passerat, 2009; Sidrach-Cardona y col., 2014), recientemente, se ha propuesto estandarizar el término de bacterias multirresistentes (MR) a aquellas que presentan resistencia adquirida a antibióticos de tres o más familias, bacterias con **multirresistencia extendida** (MRX) a aquellas que presentan resistencia adquirida a todos excepto dos de las familias de antibióticos recomendados para su uso clínico, y la **panresistencia** (PR) a aquellas que presentan resistencia adquirida a todas las familias de antibióticos recomendados (Magiorakos y col., 2012). En la presente Tesis Doctoral, como los antibióticos evaluados no pertenecen todos a los empleados en clínica, no se utiliza el término PR y se consideran bacterias con multirresistencia extendida a aquellas que presentan resistencia a antibióticos de cinco o más familias, siguiendo la tendencia observada entre diferentes autores (Amato y col., 2021; Bartholin y col., 2023).

A estos eventos de multirresistencia, hay que sumar que los genes de resistencia pueden transferirse junto a **genes de virulencia**, incrementando la amenaza de bacterias multirresistentes y de mayor virulencia y patogenicidad. Estas bacterias se denominan popularmente como “**superbacterias**” o, en inglés, “**superbugs**” (OMS, 2011) y constituyen una grave amenaza para la salud pública.

3.4. PROBLEMÁTICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Desde la irrupción de los antibióticos en el panorama científico y clínico tras el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming a principios del siglo XX, estos compuestos se han convertido en uno de los **elementos fundamentales en la lucha contra las infecciones bacterianas** (tanto en **medicina humana como veterinaria**). Sin embargo, las resistencias han ido apareciendo pocos años después de la comercialización de cada clase de antibióticos, incluso tras modificaciones estructurales para evadir los mecanismos de resistencia bacterianos, requiriendo **constantemente nuevos antibióticos** (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Pérez-Etayo, 2021). Si bien es cierto que los procesos de adquisición de resistencias **ocurren de forma natural** y son tan antiguos como los propios antibióticos, este proceso está exacerbado por factores humanos (Comisión Europea, 2017).

El **mal uso y abuso** de los antibióticos, ya sea para su empleo en personas, animales o plantas, es uno de los principales factores que contribuyen a la selección y diseminación de resistencias. Precisamente, durante décadas se han empleado los antibióticos de forma descontrolada en ganadería, como promotor de crecimiento y tratamiento profiláctico, acelerando la generación de resistencias. Este aumento de bacterias resistentes a antibióticos (BRA) limita las opciones terapéuticas incrementa la morbilidad, la mortalidad, las complicaciones y el tiempo de ingreso hospitalario (con su consecuente coste económico que se cuantifica en billones de euros). Debido a estas prácticas, la resistencia a antibióticos constituye una grave **amenaza para la salud pública a nivel global** (O'Neill, 2014; Organización Mundial de la Salud, 2011; Organización Mundial de Sanidad Animal, 2023; Pérez-Etayo, 2021).

La magnitud del problema es tal que, en 2014, se atribuían 700 000 muertes anuales a infecciones por bacterias multirresistentes, en 2019, se atribuían 1,27 millones y se estimaba que, para el año 2050, podrían aumentar a 10 millones, desbancando al cáncer como primera causa de muerte (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS, 2019; Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022; O'Neill, 2014). En el caso de España, según la AEMPS, actualmente se producen 4000 muertes como consecuencia de infecciones provocadas por bacterias resistentes (AEMPS, 2021), mientras que, según los datos de referencia de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), se estima que este valor se encuentra en torno a las 35 400 muertes anuales (SEIMC, 2018), valor cercano a las 40 000 muertes anuales que se proyectaban para el año 2050 (AEMPS, 2019). Esta situación ha llevado a establecer planes de acción para la reducción y el control del uso de antibióticos en todos los sectores, como la Estrategia Mundial para Contener la Resistencia a los

Antimicrobianos o el Plan de Acción Mundial publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2001, 2016). Estos, a su vez, han instado a la implantación de planes de acción nacionales, como el Plan de Reducción de Antibióticos (PRAN) en España.

3.5. EFECTOS DEL CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS POR EL SECTOR GANADERO

Datos de consumo

Hoy en día, la ganadería sigue siendo el sector de mayor consumo de antibióticos a nivel global, destinándose entre el 70 y el 80 % de la producción de antibióticos mundial a este sector (Marutescu y col., 2022). En algunos países, los antibióticos siguen empleándose como promotor de crecimiento (Organización Mundial de Sanidad Animal, OMSA, 2022), sin embargo, esta práctica está prohibida en la Unión Europea (UE) desde 2003 (Reglamento CE 1831/2003). Recientemente, se ha restringido también en la UE su uso como tratamiento profiláctico a “casos excepcionales” (Reglamento UE 2019/6).

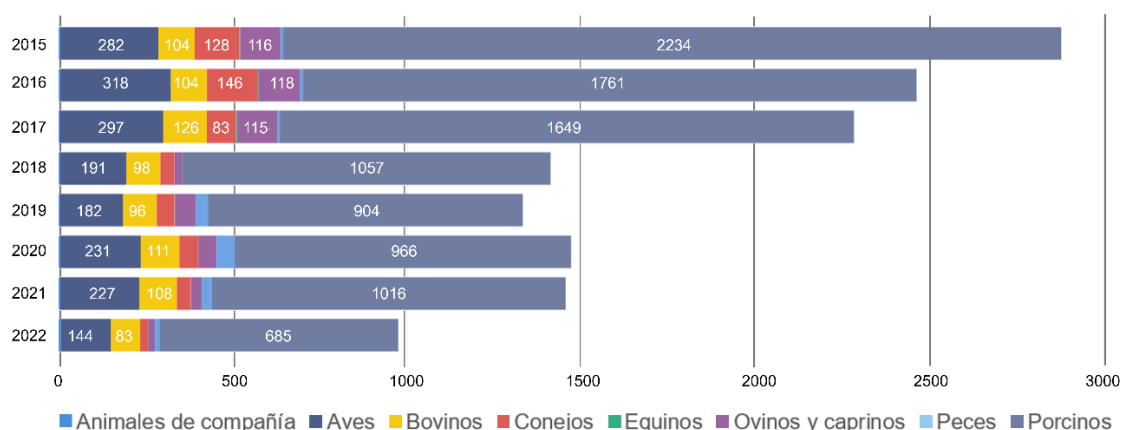


Figura I.9. Toneladas de antibióticos vendidas por especie y año por laboratorios veterinarios en España. Figura adaptada de PRAN (2023).

Concretamente, en España, gracias a las medidas establecidas por PRAN, se ha logrado disminuir un 70 % el consumo de antibióticos en sanidad animal desde el 2014 hasta el 2022 (Agencia Europea del Medicamento, 2023). Aun así, actualmente España es el país con mayor consumo de antibióticos para producción ganadera (en toneladas), y el cuarto al relacionar este con la cantidad de producto animal producido para consumo (mg/PCU). La mayor cantidad (en toneladas) se destina al sector porcino seguido del avícola y bovino, mientras que el sector cunícola recoge el mayor consumo relativo (mg/PCU), como indican las Figuras I.9 y I.10. Concretamente, la amoxicilina es el antibiótico más empleado en la ganadería española (en toneladas), especialmente empleado en ganado porcino y también en avícola. No obstante, en

unidades de mg/PCU ocuparía el tercer puesto por detrás de aminoglucósidos y tetraciclinas, las familias más empleadas en el sector cunícola.

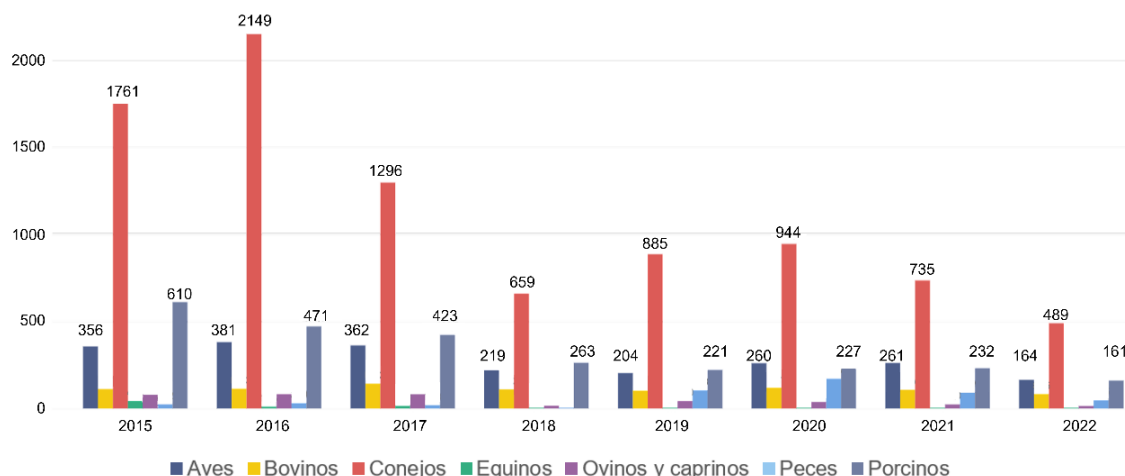


Figura I.10. Consumo de antibióticos (mg/PCU) en ganadería por especie y año. Adaptado de PRAN (2023).

Contaminación ambiental asociada: el proyecto OUTBIOTICS

Se estima que hasta el 90 % de los antibióticos administrados a los animales se excreta en heces y purines, y que una fracción significativa de estos compuestos mantienen su actividad (Kumar y col., 2005). De esta forma, ejercen presión selectiva en la comunidad microbiana del suelo, reduciendo su diversidad y fomentando la selección y abundancia de cepas resistentes. Esta es la principal vía de entrada de antibióticos al medio ambiente en zonas de actividad ganadera. Con frecuencia, el estiércol se reutiliza como enmienda y fertilizante de campos agrícolas, destinados tanto a consumo animal como humano, abriendo una vía de transmisión a través de la cadena alimentaria (Abbas y col., 2023; García y col., 2020; Marutescu y col., 2022). Además, en general, la aplicación de residuos ganaderos al terreno puede, por lixiviación, infiltración o escorrentía, generar contaminación por antibióticos en las aguas superficiales y subterráneas, promoviendo la introducción, diseminación y acumulación de bacterias resistentes a antibióticos (BRA) y genes de resistencia (GRA) en ambientes acuáticos (Jia y col., 2017; Lei y col., 2024; Marutescu y col., 2022; Pérez y col., 2022).

Junto con los antibióticos, pueden excretarse también bacterias intestinales que hayan adquirido (multi)resistencias en el tracto intestinal y promover la diseminación de GRA a través de transferencia genética horizontal (TGH) en la microbiota del suelo y el agua (Abbas y col., 2023). De esta forma, las granjas son un reservorio y foco de emisión de antibióticos, BRA y GRA

a los ecosistemas receptores: el suelo agrícola, la atmósfera y los sistemas acuáticos colindantes (Lei y col., 2024; Marutescu y col., 2022).

En este contexto, en la Universidad de Zaragoza y bajo la dirección del investigador Juan Ramón Castillo, se desarrolló OUTBIOTICS, un proyecto del Programa Europeo de cooperación del territorio POCTEFA 2014-2020 consistente en una red de colaboración para el desarrollo de tecnologías innovadoras en el diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio, conformado por departamentos y provincias próximas a la frontera entre Francia, España y Andorra. Esta región se caracteriza por tener explotaciones ganaderas intensivas (especialmente porcino, avícola y cunícola) como mayor motor económico rural. A su vez, es la responsable de las mayores emisiones de antibióticos a las aguas POCTEFA (<https://outbiotics.unizar.es/outbiotics/>).

En el marco de este proyecto, se llevó a cabo un diagnóstico de la presencia de antibióticos y bacterias resistentes a antibióticos en determinados puntos de la red de muestreo, realizando dos campañas en el 2018, una en primavera y otra en otoño (Moles, 2021; Pérez-Etayo, 2021). Entre los 40 puntos que conforman dicha red de muestreo, se tomaron muestras de aguas superficiales en ríos de la cuenca del Ebro con elevada presión ganadera (porcina, avícola, cunícola y bovina), que han servido también para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Los aminoglucósidos y la resistencia a aminoglucósidos en ganadería

Los aminoglucósidos se emplean ampliamente en la producción animal en comparación con la población humana, por lo que se considera que los animales pueden ser un importante reservorio de bacterias resistentes a estos antibióticos (Jensen y col., 2006). En España, en 2018 (año del muestreo) se consumieron 225 toneladas de aminoglucósidos para uso veterinario, destinándose el mayor consumo (en toneladas) al sector porcino y las mayores tasas por unidad de producto de consumo producido (mg/PCU) al sector cunícola. Los aminoglucósidos principalmente consumidos (de mayor a menor consumo) fueron la neomicina, la estreptomicina, la espectinomicina, la apramicina, la gentamicina y la paramomicina (Figura I.11), mientras que los empleados en clínica incluyen los naturales estreptomicina, kanamicina y gentamicina, así como los semisintéticos amikacina, etilmicina y netilmicina (PRAN, 2023; Zhang y col., 2023a).

Algunos de estos aminoglucósidos son de uso exclusivo veterinario, como la apramicina y la higromicina. La apramicina fue aprobado en España como promotor del crecimiento en 1988 y, aunque ya no se utiliza con ese fin, se sigue empleando en el sector ganadero. De hecho, es

común encontrar cepas de *E. coli* resistentes a apramicina aisladas de cerdos, normalmente otorgada por el gen *aac(3)-IV*, que causa resistencia cruzada a gentamicina y apramicina. Además, esta resistencia suele ser transmisible por plásmidos R conjugativos y estar ligada con resistencia a otros antibióticos. Tras su introducción en la ganadería, se aislaron cepas con este perfil de resistencia a partir de animales. Inclusive, mediante un experimento *in vivo*, se ha comprobado la capacidad de diseminación de resistencia a apramicina de cerdos tratados a no tratados con este antibiótico. Posteriormente, se empezó a detectar en cepas aisladas de pacientes humanos hasta tal punto que, las *Escherichia coli* aisladas de cerdos, se consideran un importante reservorio de transferencia de genes de resistencia a apramicina y gentamicina a humanos, constituyendo este un factor de riesgo al ser la gentamicina un antibiótico de primera elección para bacteremias humanas (Gómez-Lus, 1998; Herrero-Fresno y col., 2016; McGaha y Champney, 2007; Ministerio de Sanidad y Consumo, 1995; PRAN, 2023).

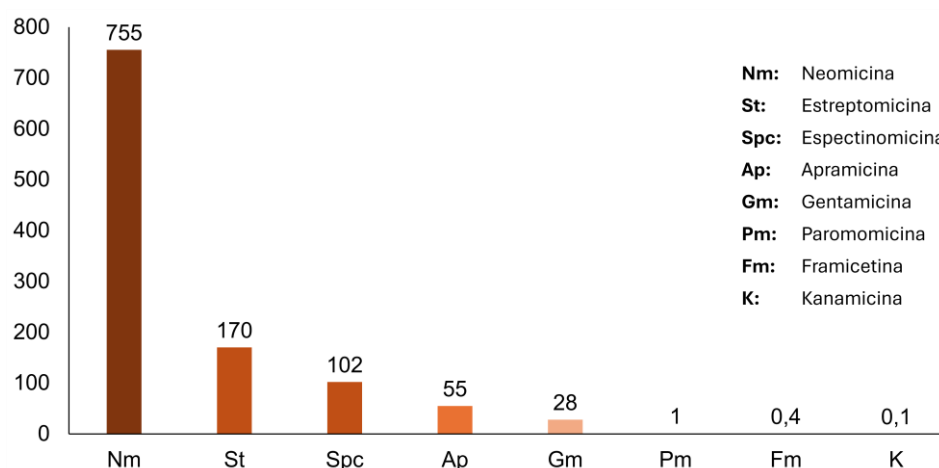


Figura I.11. Consumo de aminoglucósidos (toneladas) en ganadería. Adaptado de PRAN (2023).

Diversos estudios han confirmado el impacto de la ganadería en ríos y ecosistemas acuáticos por antibióticos, BRA y GRA y más concretamente, por el impacto de aminoglucósidos empleados en las explotaciones ganaderas. En concreto, Borella y col. (2020) observaron el aumento de bacterias resistentes a apramicina y neomicina en ecosistemas acuáticos impactados por actividades agrícolas y ganadera; Jia y col. (2017) detectaron la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos (especialmente *ant(6')-Ia*, *aac(6')-Ie*, *aph(3')-IIIa* y *ant(3'')-Ia*) y tetraciclinas entre los más dominantes en las aguas residuales de explotaciones porcinas en China, contaminando severamente el río al que descargaban sus aguas; mientras que Lei y col. (2024) encontraron que los GRA a aminoglucósidos predominaban en aguas subterráneas contaminadas por ganadería.

4. LA PERSPECTIVA “ONE HEALTH”

La perspectiva “One Health” o “Una única salud” se refiere al esfuerzo interdisciplinar para abordar la salud humana, animal y ambiental de forma holística, reconociendo que están interconectadas. Esta idea empezó a tomar forma en el siglo XIX, cuando Rudolf Virchow introdujo el concepto de zoonosis, y se ha ido reforzando con brotes de *Salmonella* relacionados con alimentos de origen animal, la encefalopatía espongiforme bovina y, recientemente, con las pandemias de la COVID-19, el virus influenza y el ébola. En 2008, los principios de Manhattan destacaron la necesidad de mantener el equilibrio de los ecosistemas para combatir enfermedades infecciosas, integrando así la salud ambiental en esta visión holística. En las últimas dos décadas, la salud ambiental ha cobrado mayor importancia al demostrarse su relación con la salud humana, la salud animal, y la sostenibilidad y resiliencia del planeta. Factores como el crecimiento exponencial de la población mundial, la urbanización, la deforestación, la extinción de flora y fauna, el calentamiento global o la contaminación están deteriorando la calidad del aire, el agua, los suelos y las materias primas, y se estima que son responsables del 23% de las muertes humanas prematuras a nivel global, que equivalen a 12,6 millones de muertes anuales (Network for Evaluation of One Health, 2018; Velázquez-Meza y col., 2022). **

Precisamente, la resistencia a antibióticos es un problema global que afecta a la salud humana, animal y ambiental. Por ello, es necesario enfocar esta problemática desde diferentes disciplinas con la misma perspectiva holística (Velázquez-Meza y col., 2022).

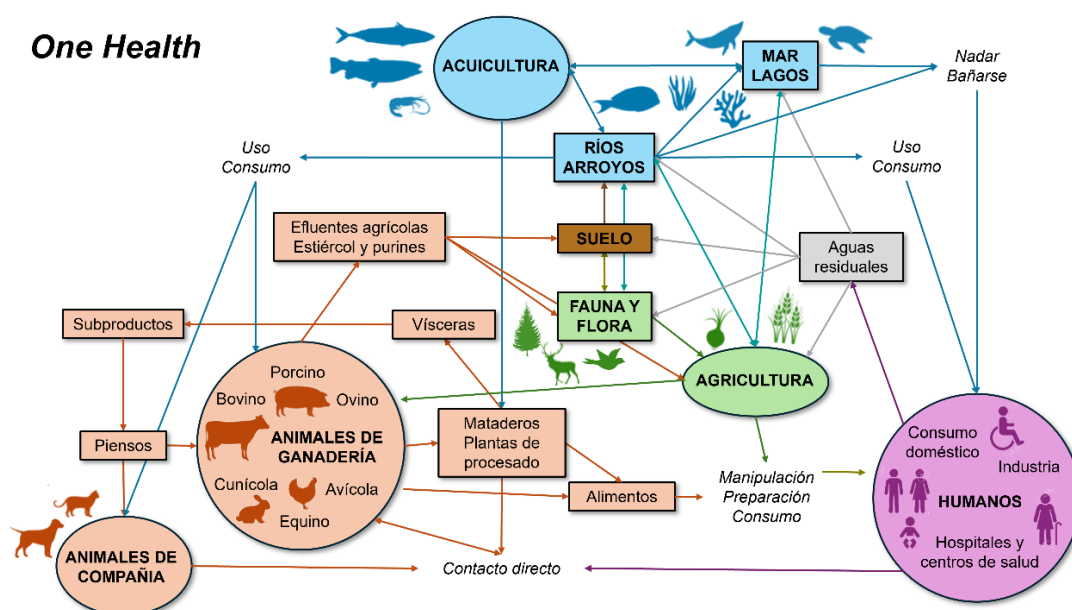
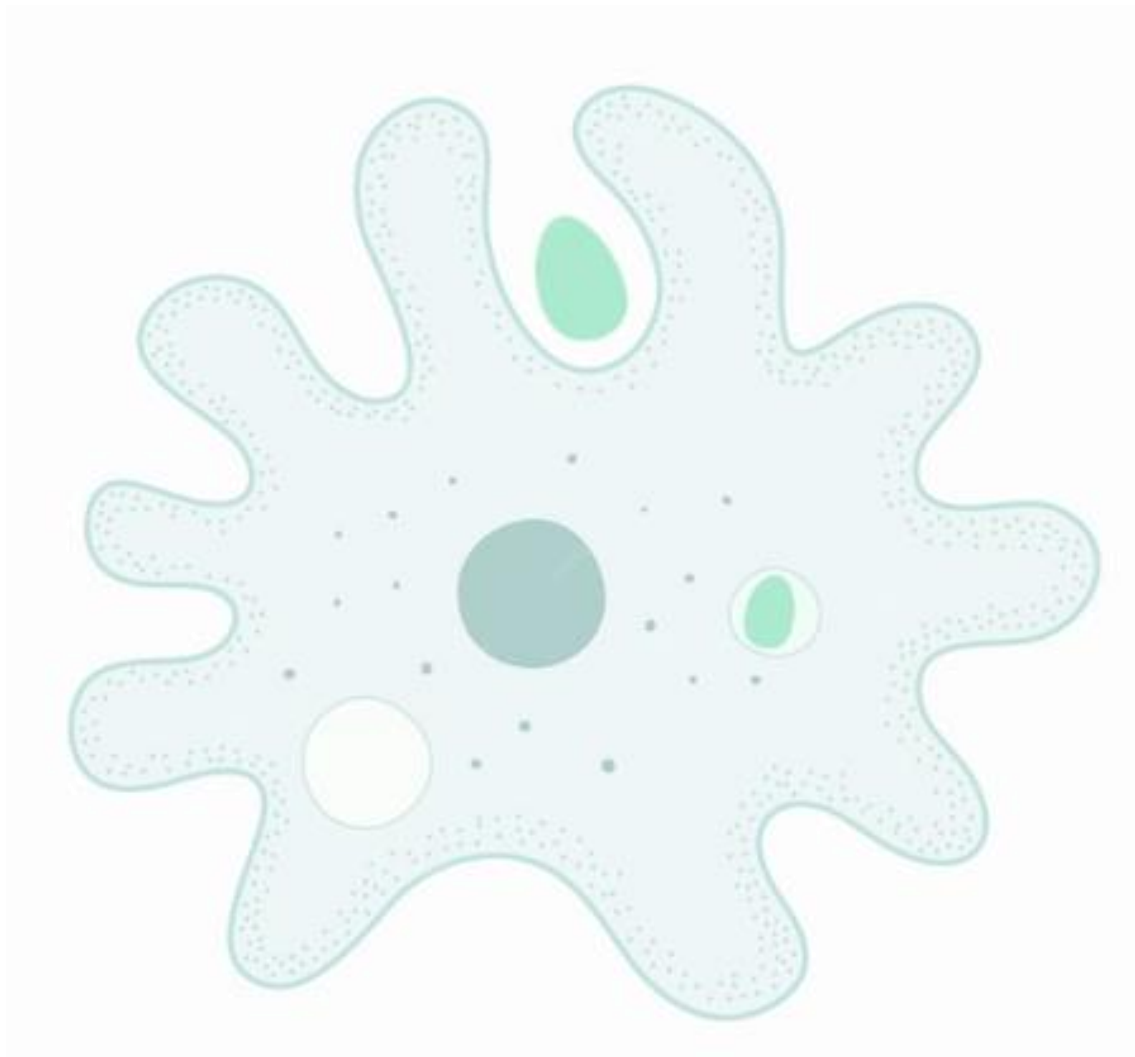


Figura I.11. Diseminación de antibióticos, bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos desde la perspectiva “una única salud”. Adaptado de Wardell (2014).

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y APORTACIONES



1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.1. LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE COMO RESERVORIO Y VECTOR DE BACTERIAS

ENDOCITOBIONTES: RIESGOS PARA LA SALUD PÚBLICA

Como muestra el Apartado 1 del Capítulo I, las regulaciones relacionadas con el ciclo urbano del agua no incluyen a las amebas de vida libre (AVL). Sin embargo, estos microorganismos, que habitan en aguas naturales, son capaces de superar tratamientos de potabilización, depuración y regeneración de aguas, y entrar en el ciclo urbano del agua, habiéndose detectado en sistemas acuáticos artificiales, donde habitan y colonizan sistemas de distribución, tuberías, sistemas de refrigeración y piscinas, entre otros (Loret y Greub, 2010; Thomas y col., 2010). Desde estas instalaciones, pueden infectar a las personas expuestas, siendo la infección más común la queratitis amebiana, cuya incidencia ha aumentado durante los últimos años asociada al incremento de usuarios de lentes de contacto (Gomes y col., 2016a).

La ameba más preocupante, por su letalidad, es *Naegleria fowleri*, descrita por primera vez en España en 2018, como agente causante de una meningoencefalitis en una niña, que la adquirió al bañarse en una piscina cubierta contaminada, en Toledo (Ruiz-Ginés y col., 2019). El aumento de las temperaturas debido al cambio climático favorece la diseminación de cepas termófilas y patógenas, como esta, reforzando la necesidad de establecer sistemas de vigilancia como medidas de prevención, control y mitigación de enfermedades infecciosas, tal y como sugiere la perspectiva “One Health” (Comisión Europea, 2017; Fernández, 2014).

Además de los posibles riesgos para la salud intrínsecos de las amebas, estas pueden portar en su interior bacterias endocitobiontes (BE), entre otros microorganismos, potencialmente patógenas. El caso más conocido e investigado es la propagación de *Legionella*, uno de los principales patógenos causantes de enfermedades de transmisión hídrica. Las AVL pueden actuar como reservorios, vectores y caballos de Troya al proteger las BE de los tratamientos de desinfección hasta sistemas acuáticos artificiales, donde las BE pueden salir de las AVL y colonizar dispositivos desde los que posteriormente infectar a las personas expuestas. Los hospitales y centros sanitarios, así como torres de refrigeración, piscinas y spas son de especial preocupación por esta vía infecciosa (Cateau y col., 2014; Greub y Raoult, 2004).

Debido a todo esto, resulta necesario llevar a cabo **estudios de vigilancia microbiológica ambiental, que incluyan tanto AVL como las BE que portan en su interior**, para así poder establecer medidas de prevención y precaución acordes a los riesgos reales y existentes. Por

ello, la presente Tesis Doctoral plantea el **estudio de las amebas de vida libre presentes en aguas de río con elevada presión ganadera, como vectores de bacterias endocitobiontes**

1.2. EL PAPEL DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE EN LA DISEMINACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS: LAS BERA

El mal uso y abuso de antibióticos, en los sectores clínicos, industriales, ganaderos y agrícolas, provoca el aumento de la presencia de antibióticos en las matrices ambientales, ejerciendo una presión selectiva que fomenta la aparición y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos (BRA). Concretamente, el ciclo del agua tiene un papel fundamental en la diseminación de antibióticos, BRA y genes de resistencia a antibióticos (GRA). Las aguas residuales urbanas (domésticas, hospitalarias y farmacéuticas) tras su paso por las depuradoras (que actúan como caldo de cultivo para la aparición y diseminación de resistencias), junto con residuos agrícolas y ganaderos, acaban en los ríos y en las aguas subterráneas que, a su vez, sirven de abastecimiento a otras poblaciones (Jia y col., 2017; Lei y col., 2024; Marutescu y col., 2022).

La acumulación de resistencias, por exposición a antibióticos y transmisión de GRA mediante mecanismos de transferencia horizontal, genera superbacterias cada vez más difíciles de tratar y el agotamiento de las opciones terapéuticas. Este conjunto de circunstancias convierte la resistencia a antibióticos en un grave problema para la salud pública: la llamada pandemia silenciosa, que se estima que en 2050 desbancará al cáncer como primera causa de muerte en Europa. Esta situación ha despertado la necesidad de establecer alternativas al uso de antibióticos, así como planes para la reducción y el control de su uso (OMS, 2011; AEMPS, 2019). Estas estrategias han de tomarse desde la perspectiva “One Health”, comprendiendo que el medio ambiente representa un importante reservorio de resistencia antimicrobiana y una ruta importante de transmisión a humanos. Por tanto, resulta importante evaluar y conocer los reservorios ecológicos de BRA y GRA (Marutescu y col., 2022).

Precisamente, las AVL pueden ser un reservorio de bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA), además de un vector y protector frente a los tratamientos de desinfección, favoreciendo su diseminación y (re)introducción en el ciclo urbano del agua, desde donde pueden infectar a personas expuestas y donde pueden adquirir nuevas resistencias (Bornier y col., 2021; Sarink y col., 2020). Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo sobre ello.

En zonas de emisión de antibióticos, donde se espera una elevada presencia de BRA, este potencial rol como reservorio, vector y protector de las AVL podrá verse especialmente

acentuado. De hecho, ya se ha detectado la presencia de BRA y GRA en AVL aisladas de depuradoras (Conco-Biyela y col., 2024), sin embargo, y hasta donde la autora conoce, nunca se han evaluado zonas adyacentes a explotaciones ganaderas. Por ello, se han seleccionado los ríos de la Cuenca del Ebro sometidos a presión ganadera porcina, avícola, cunícola y bovina como zona de estudio, dentro del territorio POCTEFA.

La mayoría de los estudios que evalúan la presencia de BRA y GRA en ecosistemas acuáticos se centran en la resistencia a betalactámicos, principalmente, junto con sulfonamidas y fluoroquinolonas (Amato y col., 2021; Pérez y col. 2022; Rodríguez-Mozaz y col., 2015), antibióticos de primera elección en medicina humana. Debido a la alta diseminación de bacterias resistentes a estos antibióticos, especialmente a la creciente diseminación de betalactamasas de amplio espectro, se han realizado muchos estudios para comprender cómo su propagación desde aguas residuales de origen doméstico o urbano afecta a la salud pública. En comparación, la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio del impacto de la actividad ganadera en la diseminación de BERA y GRA mediada por las AVL. Para ello, se ha seleccionado la resistencia a aminoglucósidos, especialmente a aquellos de uso exclusivamente veterinario como la apramicina y la higromicina (Herrero-Fresno y col., 2016; McGaha y Champney, 2007), como indicador de contaminación ganadera. Los genes de resistencia a estos antibióticos y, en general, a aminoglucósidos, suelen encontrarse codificados en integrones (Ramírez y Tolmasky, 2010), otro indicador de contaminación antropogénica (Gillings y col., 2015) también seleccionado para su estudio.

De esta manera, la presente Tesis Doctoral plantea el **estudio de las amebas de vida libre como reservorios de bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos** y la evaluación de la **influencia de actividades ganaderas en la generación y diseminación de estas resistencias**.

1.3. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN FRENTE AMEBAS DE VIDA LIBRE Y BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

Hasta la fecha, se ha demostrado que las AVL son, en general, resistentes a los tratamientos de desinfección convencionales y, aunque poco estudiado, también se ha demostrado que las BE pueden sobrevivir a estos tratamientos, protegidas en el interior de las AVL (García y col., 2007; Kilvington y Price, 1990; Thomas y col., 2008). Además de no eliminarse, estos microorganismos tampoco se vigilan, ya que los criterios e indicadores microbiológicos ni los incluyen ni los representan. Este hecho, junto con la creciente necesidad de regeneración de las aguas debido

a la escasez de agua, el cambio climático y el aumento de los usos del agua, provoca que estos microorganismos, potencialmente patógenos, se vuelvan recalcitrantes. Por ello, es necesario desarrollar tratamientos que permitan usar y reutilizar el agua acorde a los usos posteriores (Alcalde-Sanz y Gawlik, 2014).

Los procesos avanzados de oxidación han ganado popularidad en los últimos años y han demostrado ser capaces de inactivar microorganismos altamente resistentes al cloro (Forsyth y col., 2013; Zhou y col., 2014). Su posible combinación con radiación solar permite que este tipo de tratamientos sean más amigables con el medio ambiente, costo-efectivos y reproducibles en zonas en vías de desarrollo (Pichel y col., 2019).

Se ha evaluado la eficacia de PAO como la combinación de cloro y radiación ultravioleta o la fotocátalisis con TiO_2 frente a amebas (Chauque y Rott, 2021; Lonnen y col., 2005) y, en unos pocos casos, frente a bacterias protegidas por amebas (Adan y col., 2018; Wang y col., 2023a), obteniendo resultados prometedores. Sin embargo, nunca se ha evaluado la efectividad de la combinación de cloro y radiación solar (Cl_2/RS) frente *Acanthamoeba* o sus bacterias endocitobiontes. La combinación de peróxido de hidrógeno y radiación solar ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{RS}$) también ha demostrado ser un PAO eficaz frente a microorganismos resistentes a tratamientos convencionales, como las esporas de *Bacillus subtilis* o los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., no obstante, nunca se ha evaluado su efectividad frente a AVL ni mucho menos, sus BE.

Por ello, la presente Tesis Doctoral plantea la **evaluación de las amebas de vida libre como protectores de bacterias endocitobiontes** y la **propuesta de estrategias eficaces para su desinfección**.

2. OBJETIVOS

La investigación sobre el papel que desempeñan las amebas de vida libre (AVL) como vector y reservorio ambiental de bacterias endocitobiontes (BE) y de bacterias resistentes a antibióticos (BRA), la influencia que determinadas actividades ganaderas ejercen en la diseminación de resistencias a través de estos microorganismos y la aplicación de procesos de desinfección de aguas que resulten eficaces frente a AVL y BE, constituye el trabajo que fundamenta esta Tesis Doctoral, cuyos objetivos específicos se resumen en los siguientes puntos:

- Identificar las poblaciones de AVL presentes en aguas de ríos sometidos a presión ganadera de la Cuenca del Ebro
- Identificar las BE presentes en las AVL
- Evaluar la influencia de las actividades ganaderas en las comunidades microbianas de AVL y BE de ríos de la Cuenca del Ebro
- Determinar los perfiles de resistencia a antibióticos de las BE presentes en las AVL, priorizando la familia de los antibióticos aminoglucósidos
- Determinar la presencia de integrones en las BE resistentes a antibióticos
- Evaluar la influencia de las actividades ganaderas en las resistencias encontradas
- Poner a punto un protocolo para la evaluación de inactivación de cepas de AVL y sus BE
- Evaluar la efectividad de los desinfectantes convencionales, concretamente hipoclorito sódico (Cl_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radiación solar UV-A ($\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$) y radiación solar UV-A y UV-B ($\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$)
- Evaluar la efectividad de los tratamientos avanzados de oxidación, concretamente la combinación de hipoclorito sódico y radiación solar UV-A ($\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$), la combinación de hipoclorito sódico y radiación solar UV-A + UV-B ($\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$) y la combinación de peróxido de hidrógeno y radiación solar UV-A + UV-B ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$)
- Evaluar la influencia del origen de las cepas de AVL en la efectividad de los tratamientos

3. MARCO DE DESARROLLO

La presente Tesis Doctoral se ha realizado dentro del Grupo de Investigación Agua y Salud Ambiental del Instituto de Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA) de la Universidad de Zaragoza, gracias a la subvención para la contratación de Personal Investigador Predoctoral en Formación del Gobierno de Aragón Convocatoria 2019-2023 y a la financiación a través de los siguientes Proyectos:

- OUTBIOTICS: Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA (EFA 183/16) POCTEFA 2014-2020 (Cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional a través del Programa Interreg V A España/Francia/Andorra - POCTEFA 2014-2020)
- PID2022-141402NB-I00: Caracterización y control de reservorios ambientales de microorganismos patógenos y genes de resistencia a antibióticos
- TED2021-129267B-I00: OUTMICROPRESS: Aplicación de Procesos Avanzados de Desinfección de Aguas con Nanomateriales, para la Reducción del Impacto Procedente de Presiones Urbanas, en el Marco de la Economía Circular

Su desarrollo ha permitido la realización de dos estancias de investigación. Por un lado, en el grupo de investigación de Resistencias Antimicrobianas del Instituto de Salud Global (ISGlobal) de Barcelona, del 9/1/2023 al 17/3/2023, bajo la tutela de su investigador principal, Jordi Vila Estapé. Dicha estancia pudo realizarse gracias a las Subvenciones para Movilidad Predoctoral Convocatoria 2023 del Gobierno de Aragón. Por otro lado, en el Centro de Saneamiento Ambiental del Departamento de Recursos Hídricos y Ciencias Ambientales de la Universidad de Cuenca (Ecuador), del 18/11/2019 al 31/7/2020, bajo la tutela de la investigadora Verónica Pinos Vélez. Esta estancia pudo llevarse a cabo gracias al Programa de becas Iberoamérica de Santander Investigación y motiva la solicitud de la Mención Internacional para la presente Tesis Doctoral.

4. PRINCIPALES APORTACIONES DERIVADAS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA

Como consecuencia directa de la investigación realizada durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se han publicado dos artículos científicos en revistas de prestigio internacional incluidas en el “Citation Index” JCR-SCI, un capítulo de libro, y se han presentado varias comunicaciones en congresos científicos de carácter nacional e internacional. Todo ello se detalla a continuación:

Artículos científicos (Anexo II)

- Menacho, C., Soler, M., Chueca, P., Ormad, M.P., Goñi, P. 2024. Chlorine Photolysis: A Step Forward in Inactivating *Acanthamoeba* and Their Endosymbiont Bacteria. *Water* 16 (5), 668. ISSN 2073-4441. <https://doi.org/10.3390/w16050668>
- Menacho, C., Marez, C., Chueca, P., Goñi, P., Ormad, M.P. 2024. Inactivation of *Acanthamoeba* and its endosymbiont bacteria by the combination of solar light with H₂O₂. *Catalysis Today* 431, 114562. ISSN 0920-5861. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2024.114562>

Capítulo de libro

- Menacho, C., Chueca, P., Ormad, M.P., Goñi, P. 2020. Protozoos intestinales y amebas de vida libre: los grandes olvidados en las regulaciones de saneamiento de aguas residuales”. En: B. Setuáin. *Retos actuales del saneamiento de aguas residuales. Derivadas jurídicas, económicas y territoriales*. 2020. Zaragoza (España): Aranzadi, S.A.U. Thomson Reuters. ISBN 978-84-1345-460-3

Congresos científicos

- Menacho, C., Marez, C., Chueca, P., Goñi, P., Ormad, M.P. 2023. *H₂O₂ Photolysis inactivates Acanthamoeba and its protected endosymbiont bacteria*. Presentación oral. I Jornadas Doctorales. PD en Ingeniería Química y del Medio Ambiente. Zaragoza (España), 09/11/2023. Libro de resúmenes, p. 20
- Menacho, C., Chueca, P., Beltrán, A., Remacha, M.V., Larumbe, N., Ormad, M.P., Goñi, P. 2022. *Natural Aquatic Ecosystems: the role of Free-Living Amoebae as reservoir of*

Antibiotic Resistant Bacteria. Presentación oral. III National Congress of International Water Association - Young Water Professional- Spanish Chapter. Valencia (España), 16/11/2022

- Menacho, C., Soler, M., Marez, C., Chueca, P., Goñi, P., Ormad, M.P. 2022. *Amebas de Vida Libre inactivadas protegen a las Bacterias Internalizadas frente a desinfectantes convencionales*. Presentación tipo póster. VII Jornadas del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón. Zaragoza (España), 6/10/2022. Libro de Abstracts, pp. 46
- Menacho, C., Chueca, P., Goñi, P., Ormad, M.P. 2022. *Bacteria survival after free-living amoeba inactivation by the use of common disinfection water treatments*. Presentación oral. 3rd International Conference on Disinfection and DBPs. Milán (Italia), 27/06/2022. Book of Abstracts, pp. 132 - 135
- Menacho, C., Chueca, P., Goñi, P., Ormad, P. 2022. *Bacterias Internalizadas y Amebas de Vida Libre: Complicando la Efectividad de los Desinfectantes Comunes*. Presentación tipo póster. XXV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Granada (España), 02/06/2022. Libro de Abstracts, ISBN 978-84-09-40989-1
- Menacho, C., Chueca, P., Beltrán, A., Ormad, M.P., Goñi, P. 2022. *Vigilancia de Resistencias a Antibióticos en Amebas de Vida Libre: El Reservorio Natural Desconocido*. Presentación tipo póster. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Granada (España), 02/06/2022. Libro de Abstracts, ISBN 978-84-09-40989-1
- Menacho, C., Chueca, P., Remacha, M.V., Larumbe, N., Ormad, M.P., Goñi, P. 2022. *Las amebas de vida libre: reservorio de bacterias resistentes a antibióticos*. Presentación de vídeo científico. XVI Congreso Español y VI Congreso Iberoamericano de Salud Ambiental. Madrid (España), 18/05/2022. Revista de Salud Ambiental, L. XXII, p. 152. ISSN 1697-2791.
- Menacho, C., Chueca, P., Goñi, P., Ormad, M.P. 2022. *Desinfección de aguas: en busca de un tratamiento para amebas de vida libre y las bacterias protegidas*. Presentación de vídeo científico. XVI Congreso Español y VI Congreso Iberoamericano de Salud Ambiental. Madrid (España), 18/05/2022. Revista de Salud Ambiental, XXII, p. 191. ISSN 1697-2791.
- Menacho, C., Chueca, P., Pascual del Riquelme, A.J., Matovelle, C., Ormad, M.P., Goñi, M.P. *Las amebas de vida libre como vectores de enfermedades oportunistas*.

Presentación escrita. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. En línea, 05/06/2021. Libro de Abstracts, pp. 401. 2021. ISBN 978-84-09-30989-4

- Menacho, C. 2020. *¿Está enferma nuestra comida? Uso de Antibióticos en la Industria Alimentaria. Mirando hacia una Industria Sostenible y Sustentable*. Presentación oral. I Webinar Ciencia, Tecnología, Comercialización y Seguridad Alimentaria en Tiempos de Pandemia. Visión de Ingenieros en Alimentos y Afines. En línea, 01/10/2020
- Menacho, C., Chueca, P., Ormad, M.P., Goñi P. *Papel de las Amebas de Vida Libre como Reservorio de Bacterias Potencialmente Patógenas*. Vídeo científico. VI Jornadas IUCA. En línea, 17/09/2020.
https://www.youtube.com/watch?v=Xos6xLizq5k&list=PLVFaquMRhyOz3cASV18aLBAHuVJW73S_&index=14&ab_channel=IUCAUNIZAR
- Menacho, C., Goñi, P., Benito, M., Gómez, J., Ormad, M.P. 2019. *Evaluación de procesos en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental*. Presentación oral. XXXVI Jornadas Nacionales de Ingeniería Química. Zaragoza, 4/9/2019. Libro de resúmenes, pp. 145 – 146. ISBN 978-84-16723-69-0

Asimismo, fruto de algunas de estas comunicaciones a congresos, la Doctoranda ha sido galardonada con el Premio SESPAS A la Mejor Comunicación de Salud Pública, otorgado por la Sociedad Española de Salud Pública y Administración Sanitaria por el trabajo titulado "Desinfección de Aguas: en busca de un Tratamiento para Amebas de Vida Libre y sus Bacterias Protegidas" presentado en el XVI Congreso Español y V Congreso Iberoamericano de Salud Ambiental, celebrado en Madrid del 18 al 20 de mayo de 2022, y con el Premio al Mejor Vídeo Científico en la Categoría de No Doctor, otorgado por el Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA) por el vídeo científico titulado "Papel de las Amebas de Vida Libre como Reservorio de Bacterias Potencialmente Patógenas" presentado en las VI Jornadas IUCA, celebrado en modalidad "online" el 18 de septiembre de 2020.

Por otro lado, como consecuencia de la estancia de investigación realizada en el Centro de Saneamiento Ambiental del Departamento de Recursos Hídricos y Ciencias Ambientales de la Universidad de Cuenca (Ecuador), se ha publicado el siguiente artículo científico en colaboración con la misma:

Menacho, C., Montufar, T., Sánchez, E., Larriva, G., López, C.L., Cisneros, J.F., Ormad, M.P., Goñi, P., Pinos-Vélez, V. 2024. Evaluation of some selected antibiotics and dyes

removal by fungi isolated from wastewater sludge. *Bioremediation Journal*, 1 - 17. ISSN 1088-9868. <https://doi.org/10.1080/10889868.2024.2335909>

4.2. CONTRIBUCIÓN A LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE

La presente Tesis Doctoral contribuye a la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) acordados como parte de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible (Naciones Unidas, 2015), especialmente a la consecución del ODS 6, que tiene como objetivo garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos. Así mismo, contribuye de forma indirecta a los ODS 3 “Salud y Bienestar”, ODS 9 “Industria, innovación e infraestructura”, ODS 11 “Ciudades y comunidades sostenibles”, ODS 12 “Producción y consumo responsables” y ODS 17 “Alianzas para lograr los objetivos”. Concretamente, los objetivos y el desarrollo de esta Tesis Doctoral se alinean con las siguientes metas relativas a los ODS:

3.9. Para 2030, reducir sustancialmente el número de muertes y enfermedades producidas por productos químicos peligrosos y la contaminación del aire, el agua y el suelo.

6.3. De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial.

6.6.a. De aquí a 2030, ampliar la cooperación internacional y el apoyo prestado a los países en desarrollo para la creación de capacidad en actividades y programas relativos al agua y el saneamiento, como los de captación de agua, desalinización, uso eficiente de los recursos hídricos, tratamiento de aguas residuales, reciclado y tecnologías de reutilización.

9.5. Aumentar la investigación científica y mejorar la capacidad tecnológica de los sectores industriales de todos los países, en particular los países en desarrollo, entre otras cosas fomentando la innovación y aumentando considerablemente, de aquí a 2030, el número de personas que trabajan en investigación y desarrollo por millón de habitantes y los gastos de los sectores público y privado en investigación y desarrollo.

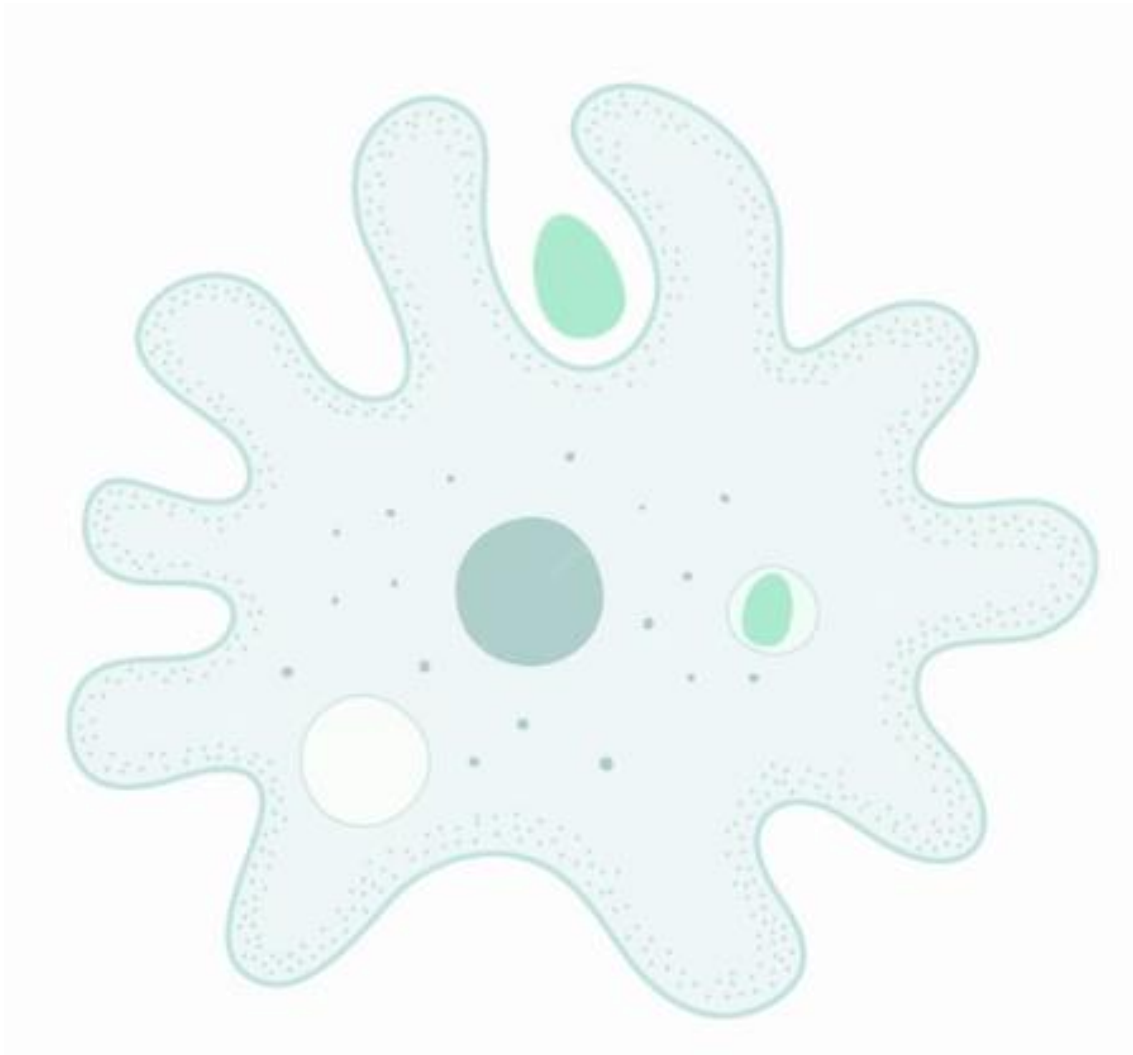
11.6. De aquí a 2030, reducir el impacto ambiental negativo per cápita de las ciudades, incluso prestando especial atención a la calidad del aire y la gestión de los desechos municipales y de otro tipo.

12.2. De aquí a 2030, lograr la gestión sostenible y el uso eficiente de los recursos naturales

17.17. Fomentar y promover la constitución de alianzas eficaces en las esferas pública, público-privada y de la sociedad civil, aprovechando la experiencia y las estrategias de obtención de recursos de las alianzas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE AMEBAS DE VIDA LIBRE PRESENTES EN AGUAS SUPERFICIALES

1.1. MUESTRAS DE AGUA

Las muestras de agua empleadas para el aislamiento de amebas de vida libre se toman en diferentes puntos de la cuenca del Ebro, en zonas con presión ganadera, especialmente porcina y avícola. Se toman muestras de 500 mL de agua superficial en la primavera de 2018 (primera campaña de muestreo) y en el otoño de 2018 (segunda campaña de muestreo) como parte del proyecto OUTBIOTICS-POCTEFA 2014-2020 (<https://outbiotics.unizar.es/>). Estas muestras se conservan a temperatura ambiente en oscuridad hasta su posterior filtrado. La ubicación de las estaciones de muestreo (EM) está indicada en la Figura III.1 y, en adelante, se denominan EM.1 – EM.7. La información relativa a los ríos y la presión ganadera existente en dichos puntos se muestra en la Tabla III.1. A lo largo del documento, se hace referencia al muestreo de la primera campaña, añadiéndoles el número 1 (EM.1.1, EM.2.1, EM.3.1, etc.) y, al muestreo de la segunda campaña, añadiéndoles el número 2 (EM.1.2, EM.2.2, EM.3.2, etc.).

Tabla III.1. Situación de las estaciones de muestreo (EM), caudal (m³/s) y presión ganadera existente (Moles, 2021).

ESTACIÓN	RÍO	MUNICIPIO (PROVINCIA)	Caudal		PRESIÓN GANADERA			
			C1	C2	Avícola	Bovina	Cunícola	Porcina
EM.1	Segre	Torres de Segre (Lérida)	380	80	X			X
EM.2	Noguera Ribagorzana	Corbins (Lérida)	9	6	X		X	X
EM.3	Clamor Amarga	Zaidín (Huesca)	3	4	X	X	X	X
EM.4	Cinca	Fraga (Huesca)	416	41	X		X	X
EM.5	Alcanadre	Sariñena (Huesca)	24	9	X			X
EM.6	Flumen	Albalatillo (Huesca)	12	5	X	X	X	X
EM.7	Gállego	Zaragoza (Zaragoza)	67	6	X	X	X	

C1: campaña 1 (primavera 2018); C2: campaña 2 (otoño 2018).

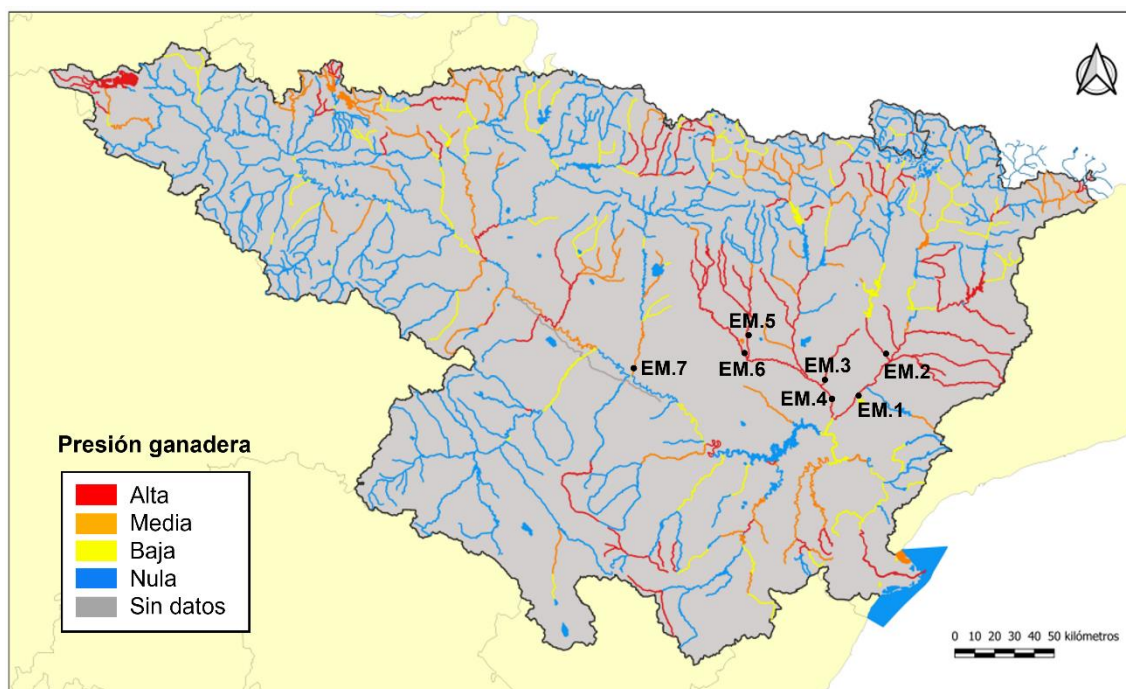


Figura III.1. Estaciones de muestreo de aguas naturales de la Cuenca del Ebro con presión ganadera estudiadas. Figura adaptada del informe Impress (2020).

1.2. MEDIOS DE CULTIVO

Solución salina de Neff's Modificada (PAS)

Solución empleada para la preparación de los medios para el cultivo de amebas. Composición cada 100 mL de PAS: 1,2 g de NaCl, 0,04 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,04 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,42 g de Na_2HPO_4 , 1,36 g de KH_2PO_4 y 2 g de Agar-agar (Scharlab S.L., Barcelona, España).

Agar No Nutritivo con *Escherichia coli* inactivada térmicamente

Medio de cultivo sólido empleado para el aislamiento y crecimiento de amebas de vida libre (AVL). Tras la preparación y dispensación del agar no nutritivo (ANN) en placas, se dispersa una suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 inactivada térmicamente (10 minutos a 65 °C en baño maría). Composición de 1 L de ANN: 100 mL de PAS, 900 mL de agua destilada y 15 g de agar bacteriológico (BD Difco™, Fisher Scientific S.L., Madrid, España) (Goñi y col., 2014).

Medio PPYG (Proteosa, Extracto de Levadura, Glucosa)

Medio de cultivo líquido empleado para el crecimiento de amebas y la conservación de cultivos axénicos. Composición de 1 L de PPYG: 20 g proteasa peptona (BD Difco™), 5 g extracto levadura (BD Difco™), 5 g glucosa (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España), 50 ml solución PAS y 950

ml de agua destilada. Una vez esterilizado el medio líquido, el medio PPYG se suplementa con ampicilina (concentración final de 250 µg/mL), estreptomycin (250 µg/mL) y fungizona (30 µg/mL) para evitar el posible crecimiento de bacterias y hongos provenientes del interior de las amebas (Drozanski y Drozanska, 1961; Goñi y col., 2014).

1.3. AISLAMIENTO, CULTIVO Y AXENIZACIÓN

Las muestras de agua se filtran en una rampa de filtración Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para ello, se usa un filtro estéril de 0,7 µm de poro y 47 mm de diámetro (Millipore). Tras filtrar 500 mL de muestra de agua, el filtro se coloca poniendo en contacto el sedimento con el agar de una placa de ANN inoculada con *E. coli* inactivada térmicamente. Las placas con los filtros se incuban a 30 °C. Tras 24 horas, se retira el filtro y se mantienen las placas incubando a 30 °C durante varias semanas (Fernández, 2014).

Este medio de cultivo sólido permite que las bacterias *E. coli*, que mantienen su forma y están metabólicamente inactivadas, sirvan de alimento para las amebas. Las amebas van alimentándose, proliferando, desplazándose por la placa y enquistándose. Para aislar las AVL, se observan las placas diariamente mediante un microscopio óptico a 12,5x, se seleccionan los trofozoítos y quistes que morfológicamente tienen las mismas características y se recorta una superficie del medio que los contenga, con un asa de siembra. Esta porción se coloca sobre otra placa de ANN y se deja incubar a 30 °C. Este proceso se repite tres veces para asegurar el aislamiento de una sola cepa (Page, 1988). Los trofozoítos o quistes con morfología diferente se resiembran en placas diferentes (Figura III.2).

Una vez aislado un único morfotipo y, habiendo crecido una alta población de amebas en la placa de cultivo, se vierten 1 o 2 mL de suero fisiológico (SFE) sobre el agar y, con un asa Digrafsky, se frota la superficie cuidadosamente en diferentes direcciones para separar los trofozoítos y quistes del agar y suspenderlos en el SFE. Con una micropipeta, se toma el volumen de SFE y se transfiere a un eppendorf estéril. Este se centrifuga durante 10 minutos a 6000xg. Posteriormente, se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en SFE ácido (pH 3) y se deja incubar 10 minutos para eliminar las bacterias libres que pueda contener el precipitado. Transcurrido este tiempo, se centrifuga el eppendorf a las mismas condiciones y el precipitado se lava con SFE. Se centrifuga de nuevo y, posteriormente, el precipitado se inocula en un tubo de vidrio estéril con 5 mL de medio PPYG reforzado con antibiótico y fungicida. El tubo con la AVL aislada en medio líquido se incuba a 30 °C hasta su posterior uso.

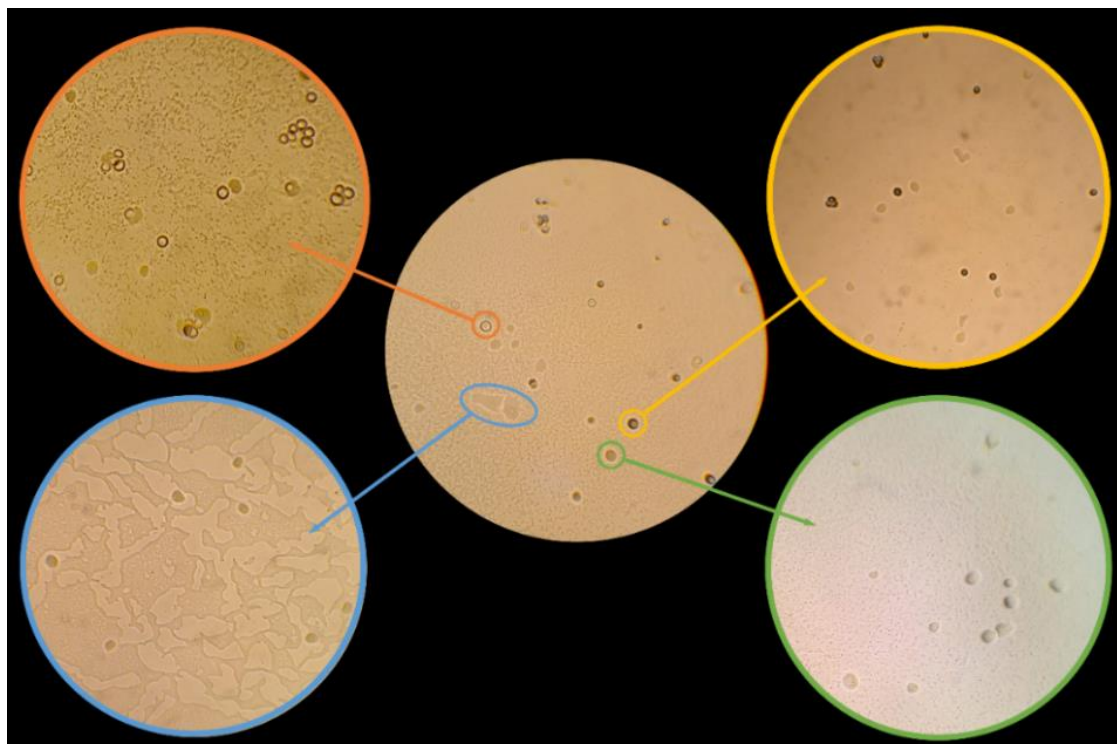


Figura III.2. Los trofozoitos y quistes morfológicamente diferentes se resiembran en nuevas placas de ANN con *E. coli* para aislar las AVL. Microscopía óptica (12,5x).

1.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

1.4.1. Recuento mediante hemocitómetro

La cámara de recuento Neubauer o hemocitómetro es un portaobjetos de precisión empleado para contar células por microscopía óptica. Cada portaobjetos tiene dos cámaras de recuento divididas en cuadrículas de 3 mm x 3 mm. La sección en la que se introduce la muestra tiene una profundidad de 0,1 mm, estableciendo un volumen fijo una vez colocado el cubreobjetos. Mediante microscopía óptica, puede observarse la cuadrícula, dividida en nueve cuadrantes de 1 mm x 1 mm, tal y como se muestra en la Figura III.3. Los cuatro cuadrantes extremos suelen emplearse para el recuento de células grandes (como es el caso), mientras que el cuadrante central suele emplearse para el recuento de células pequeñas. Al conocerse las dimensiones de la cámara, se conoce específicamente el volumen en el que se está realizando el recuento y, por tanto, la concentración de células puede calcularse mediante la Ecuación III.1 (Hoffman, 2006). Pueden realizarse además pasos previos de concentración (mediante centrifugación) o dilución de la muestra para facilitar el recuento, en cuyo caso, se debe aplicar el factor de dilución correspondiente.

$$\text{Ecuación III.1. Concentración (células/mL)} = \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes}} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

Esta metodología no diferencia entre células (amebas) vivas y muertas. Para diferenciarlas, se utiliza el método de exclusión con azul de tripán. Este colorante puede penetrar a través de las paredes dañadas y, por tanto, sólo difunde en el interior de células muertas (Strober, 2001).

Para calcular la concentración de amebas vivas, se añade solución de azul tripán al 0,4 % (m/V) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en proporción 1:1 con la muestra a analizar, se homogeneiza la muestra y se deja incubando el tiempo indicado por la casa comercial. Transcurrido el tiempo de espera, se homogeneiza la muestra (agitando), se inoculan 10 μL en la cámara de Neubauer y, mediante un microscopio óptico ZEISS-Axiostar plus, se cuentan el número de trofozoítos y quistes no teñidos para calcular su concentración mediante la Ecuación III.1. La concentración obtenida corresponde a trofozoítos y quistes viables.

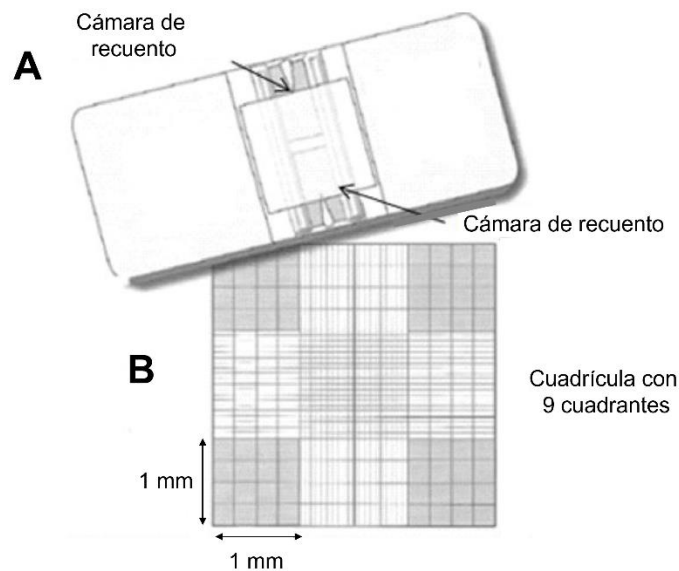


Figura III.3. Cámara de Neubauer o hemocitómetro. A. Visión macroscópica donde se muestran las cámaras de recuento. B. Visión microscópica donde se observan los nueve cuadrantes de recuento. Figura editada de Requena y Gil (2020).

1.4.2. Método del número más probable

El método del Número Más Probable (NMP) es una técnica que permite estimar, sin necesidad de recuento, la concentración de organismos vivos presentes en un líquido. Consiste en la incubación de alícuotas de diluciones de la muestra problema y el examen posterior de presencia o ausencia de crecimiento de las alícuotas, entendiendo como crecimiento la presencia de al menos un organismo en la alícuota. Mediante computación, se han desarrollado tablas que aproximan el número más probable de organismos en función del número de alícuotas que muestran crecimiento (Tillet y Coleman, 1985; Tillett, 1987). Para el presente estudio, se adapta la metodología descrita por Beattie y col. (2003) y Buck y Rosenthal (1996).

Se preparan diluciones seriadas 10^{-1} y 10^{-2} a partir de la muestra problema. Se inoculan 10 μL de la muestra problema (10^0) y de sus diluciones en el medio de cultivo apropiado para el microorganismo de estudio (ANN con *E. coli* inactivada). Cada inoculación se realiza por quintuplicado. Adicionalmente, se inoculan 100 μL de las muestras por quintuplicado en otra placa. En el caso de las AVL, todas las placas se incuban entre 7 y 15 días a 30 °C y se observan con regularidad por observación directa mediante microscopía óptica para determinar la presencia o ausencia de al menos un microorganismo de estudio vivo; se marcan como positivas las inoculaciones en las que se observen trofozoítos y/o caminos en el césped de bacterias y, como negativas las restantes (aquellas en las que se observan quistes o no se observa nada), tal y como se muestra en la Figura III.4. Los resultados se traducen en un código de tres números en el que cada dígito corresponde al número de muestras positivas de las inoculaciones directa, 10^{-1} y 10^{-2} . Mediante ese código y, utilizando la tabla de Beattie y col. (2003), se obtiene el número más probable (NMP) de microorganismos que contiene la muestra problema por mililitro (Tabla III.2). Por ejemplo, una muestra en la que se hayan detectado cuatro alícuotas positivas de aquellas inoculadas directamente, tres positivas de las inoculadas a partir de la dilución 10^{-1} y una alícuota positiva a partir de la dilución 10^{-2} , tendrá el código “431” y, según la tabla del NMP, 310 células/mL. Si no se detecta crecimiento en ninguna de las alícuotas de 10 μL , se han de observar las inoculaciones de 100 μL y, si tampoco se detecta crecimiento en ninguna de ellas, se considera que no hay ningún microorganismo y, en caso de evaluarse su inactivación, se considera que se ha producido “inactivación total” del mismo (“total kill” o “TK” por sus siglas en inglés).

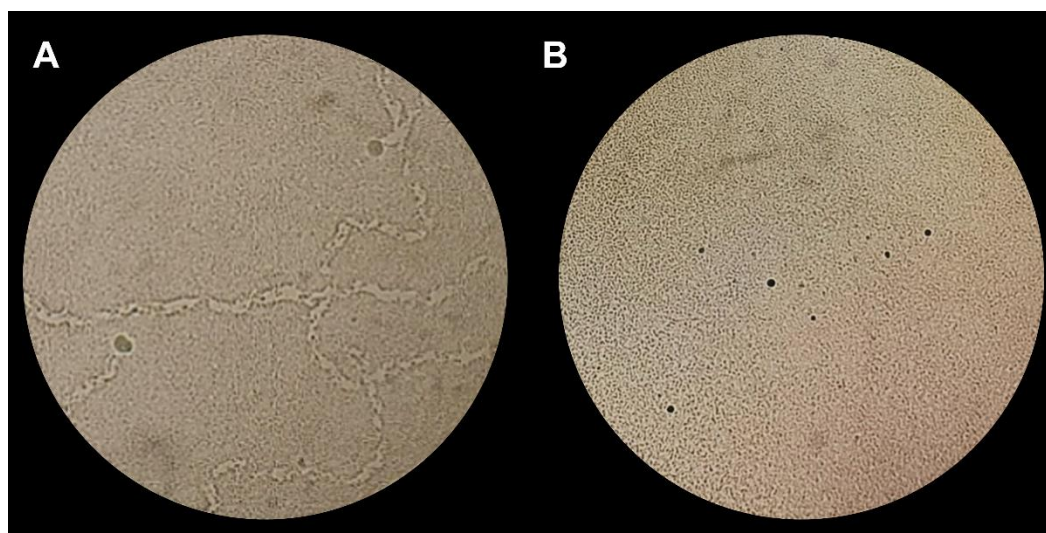


Figura III.4. Observación directa mediante microscopía óptica (12,5x) de inoculaciones en placa de ANN con *E. coli* para determinar la presencia o ausencia de crecimiento de AVL. A. Inoculación positiva: trofozoítos y caminos en el césped de bacterias. B. Inoculación negativa: observación de quistes.

Tabla III.2. Estimación del número más probable (NPM) de *Acanthamoeba* por mililitro, examinando cinco alícuotas de cada dilución (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}). Adaptado de Beattie y col. (2003) y Tillett (1987).

Nº de alícuotas positivas			NMP	RMP*	Nº de alícuotas positivas			NMP	RMP*
10^0	10^{-1}	10^{-2}			10^0	10^{-1}	10^{-2}		
0	0	0	<1	<1	4	4	0	320	290-340
0	0	1	20	20	4	4	1	380	340-410
0	1	0	20	20	5	0	0	220	200-230
1	0	0	20	20	5	0	1	290	250-340
1	0	1	40	40	5	0	2	410	360-500
1	1	0	40	40	5	1	0	310	270-360
1	2	0	50	50	5	1	1	430	360-500
2	0	0	40	40	5	1	2	600	500-700
2	0	1	50	50	5	1	3	850	700-950
2	1	0	50	50	5	2	0	500	400-550
2	1	1	70	70	5	2	1	700	600-800
2	2	0	70	70-90	5	2	2	950	800-1100
2	3	0	110	110	5	2	3	1200	1050-1350
3	0	0	70	70	5	3	0	750	650-900
3	0	1	90	90	5	3	1	1100	900-1250
3	1	0	90	90	5	3	2	1400	1200-1600
3	1	1	130	130	5	3	3	1750	1550-2000
3	2	0	130	130	5	3	4	2100	1850-2400
3	2	1	160	140-160	5	4	0	1300	1100-1500
3	3	0	160	140-160	5	4	1	1700	1500-2000
4	0	0	110	110-130	5	4	2	2200	1900-2500
4	0	1	140	140-160	5	4	3	2800	2400-3200
4	1	0	160	140-160	5	4	4	3450	3000-3900
4	1	1	200	180-200	5	5	0	2400	2000-2800
4	2	0	200	180-220	5	5	1	3500	2900-4200
4	2	1	250	230-270	5	5	2	5400	4500-6600
4	3	0	250	230-270	5	5	3	9100	7500-11000
4	3	1	310	290-340	5	5	4	16000	13500-19000
					5	5	5	>18000	>18000

*El rango más probable (RMP) tiene un intervalo de confianza del 95 %.

1.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1.5.1. Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa

La extracción de ADN total de las AVL se realiza utilizando el kit comercial Norgen Stool Isolation Kit (Norgen Bioteck Corp., Thorold, Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído, la muestra de ADN se conserva en congelación (-20 °C) hasta su posterior uso.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es un método de síntesis de ADN *in vitro*, que permite amplificar el número de copias de un fragmento de ADN específico al ser delimitado por unos cebadores o iniciadores (“primers” en inglés) previamente seleccionados y añadidos a la reacción. Este proceso lo lleva a cabo una enzima ADN polimerasa termoestable mediante repetidos ciclos de temperaturas, de forma que, en caso de estar presente la secuencia de ADN diana en la muestra de ADN de estudio, se obtienen millones de copias de esta. Este elevado número de copias (amplificaciones) podrá posteriormente detectarse para confirmar la presencia de la secuencia diana o, secuenciarse, entre otras finalidades (Tamay de Dios y col., 2013).

Para la identificación de las AVL aisladas, se realizan PCRs con diferentes cebadores específicos de amebas, concretamente, se emplean cebadores genéricos para amebas de vida libre (FLA) que amplifican la región conservada del gen 18 S ribosomal, cebadores específicos para *Acanthamoeba* (JDP) que amplifican la región ASA.S1 del gen 18 S ribosomal y una PCR múltiple específica para *Naegleria* (ITS) y *Naegleria fowleri* (FW) que amplifica la región ITS/5,8 S del gen ribosomal. Los cebadores y el tamaño de los subproductos de las PCR se indican en la Tabla III.3. Las condiciones de las PCRs y las concentraciones de los reactivos necesarios para la preparación de la mezcla de reacción se detallan en la Tabla III.4. Una vez preparadas las mezclas de reacción, se introducen en un termociclador (ThermoCycler 2720, Applied Biosystems™) y se someten a los diferentes programas de ciclos de temperaturas específicos, tal y como se detalla en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Secuencia de los cebadores, tamaño de los productos (pb) y programas de PCR empleados para la identificación de amebas de vida libre.

IDENTIFICACIÓN	CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5' – 3')	TAMAÑO PRODUCTO	CICLOS DEL PROGRAMA						REFERENCIA
				C1	C2		C3	C4		
Amebas de Vida Libre	FLA-F	CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC	800-1500	94 °C	40 ciclos			72 °C	4 °C	Tsvetkova y col., 2004
	FLA-R	CAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTAAC		5 min	94 °C 1 min	63 °C 1 min	74 °C 2 min	10 min		
Acanthamoeba spp.	JDP-1	GCCCAGATCGTTTACCGTGAA	432-551	95 °C	45 ciclos			72 °C	4 °C	Schroeder y col., 2001
	JDP-2	TCTCACAAGCTCTAGGGAGTCA		7 min	95 °C 1 min	60 °C 1 min	72 °C 2 min	10 min		
Naegleria spp. y N. fowlerii	ITS-1	GAACCTGCGTAGGGATCATT	453	35 ciclos						Pélandakis y Pernin, 2002
	ITS-2	TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA								
	FW-1	GTGAAAACCTTTTTTCCATTTACA	400	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
	FW-2	AAATAAAAGATTGACCATTGAAA		5 min	30 s	30 s	45 s	5 min		

Tabla III.4. Concentración final de los reactivos en las mezclas de reacción de las PCR empleadas para la identificación de amebas de vida libre.

COMPUESTO	FLA	JDP	ITS/FW
Tampón de reacción^a	1x	1x	1x
MgCl₂^a	6 mM	4 mM	1,5 mM
dNTPs^b	0,4 mM	0,25 mM	0,2 mM
Cebador^c	0,8 µM	0,5 µM	0,4 µM ITS y 0,8 µM FW
Taq polimerasa^d	0,1 U/µL	0,05 U/µL	0,05 U/µL
Volumen ADN:mezcla	1:25	1:25	1:10

^aBiotoools, B&M Labs, S.A. (Madrid, España). ^bBioton Life Science (Macierzysz, Polonia). ^cIsogen Lifescience B.V. (Utrecht, Países Bajos). ^dIbian Technologies, S.L. (Zaragoza, España).

1.5.2. Electroforesis en gel de agarosa y visualización

Preparación del gel de agarosa

Una vez realizadas las PCR, y para confirmar la amplificación, se procede a analizar la presencia de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se prepara una disolución de agarosa al 1,5 % (m/V) en TBE x 0,5 (Tris 0,045 M, SERVA Electroforesis GmbH, Heidelberg, Alemania; ácido bórico 0,045 M y EDTA 0,001 M, Panreac Química S.L.U., Barcelona, España; a pH 8). Esta solución se lleva a ebullición. Se añade bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para la visualización posterior del ADN. La solución de agarosa se vierte en una cama de electroforesis y se coloca un peine que formará los pocillos del gel para la posterior inoculación de las respectivas muestras en ellos. Tras su solidificación, la cama con el gel se introduce en la cubeta de electroforesis y se rellena con TBE x 0,5 hasta que el gel quede completamente sumergido. Este tampón sirve a la vez para conducir la electricidad y para controlar el pH.

Carga del gel y electroforesis

En cada pocillo se inoculan 10 µL de muestra a la cual, se le ha añadido 1 µL de la solución de carga (1 % SDS, 50 % glicerol, 0,05 % azul de bromofenol, Sigma Aldrich) para proporcionarle densidad. En uno de los pocillos se inoculan 5 µL del marcador de pesos moleculares λ PstI 200 U (Promega Biotech Ibérica S.L., Alcobendas, España) mezclados con 1 µL de la solución de carga. Una vez cargado el gel, se conecta la cubeta a una fuente de corriente de 90 V durante 45 – 60 minutos. Las muestras de ADN avanzan a través del gel de agarosa a diferentes velocidades

en función de su tamaño, permitiendo la separación de los productos de PCR para facilitar su visualización posterior (Fernández, 2014).

Visualización

Una vez el marcador molecular y las muestras han avanzado a través del gel, se visualiza el mismo mediante luz UV emitida por un transiluminador Vilbert Lourmat™. El bromuro de etidio es un compuesto intercalante que se adhiere a las hebras de ADN y que, al excitarse mediante luz UV, emite fluorescencia, permitiendo la visualización de los productos de PCR como bandas a diferentes distancias del pocillo (o “alturas”) en el gel (Fierro, 2014). Comparando la “altura” de las bandas con las del marcador de peso molecular (Figura III.5.a), se puede conocer el tamaño molecular de los amplicones obtenidos tras la PCR. Una banda a la “altura” correspondiente al peso esperado (pares de bases, pb) según los cebadores utilizados (Tabla III.3) indica que la muestra de ADN extraída del cultivo de AVL es positiva para el género en cuestión. En el caso de utilizar los cebadores FLA, la presencia de más de una banda indica que el cultivo del que se ha extraído el ADN es un cultivo mixto.

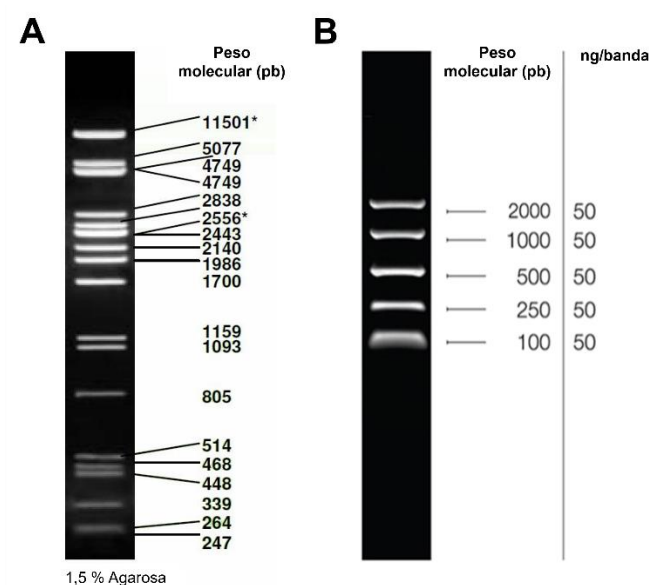


Figura III.5. Bandas del marcador de peso molecular (a) λ PstI y (b) EasyLadder I.

1.5.3. Purificación del producto de PCR, secuenciación, análisis y registro de secuencias

Purificación

Una vez obtenidas PCR positivas para algunos de los cebadores empleados, se realiza una segunda PCR idéntica a la primera, tal y como se indica en el Apartado III.1.5.1, para obtener un mayor volumen de producto de PCR. Posteriormente, se repite el proceso de electroforesis, tal y como se detalla en el Apartado III.1.5.2, pero inoculando el volumen total de producto de PCR en un mismo pocillo (con la solución de carga en proporción 10:1). Una vez finalizada la electroforesis y, mientras se visualiza el gel en el transiluminador, se recortan del gel la o las bandas pertenecientes a los amplicones de interés y se coloca cada una en un tubo eppendorf. Estas muestras pueden conservarse en refrigeración (4 °C) hasta la posterior purificación del ADN, la cual se lleva a cabo mediante el kit Favor Prep™ Gel/PCR Purification Mini kit (Favorgen® Biotech Corp., Ping Tun, Taiwan), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Electroforesis de comprobación

Una vez purificados los amplicones, se realiza una electroforesis de comprobación, siguiendo las indicaciones del Apartado III.1.5.2, pero inoculando 3 µL de la muestra de ADN purificado con 1 µL de la solución de carga. Para esta electroforesis, se emplea el marcador de peso molecular EasyLadder I (Bioline, Meridian Life Science, Tennessee, Estados Unidos), que permite estimar cualitativamente la concentración de ADN de la muestra (Figura III.5.b). Las muestras que presenten una única banda definida con el peso molecular esperado estarán listas para secuenciar.

Secuenciación y análisis de la secuencia

Una vez purificados y comprobados, los amplicones se envían para su secuenciación al Servicio de Secuenciación del IACS de la Universidad de Zaragoza. Este servicio proporciona dos electroferogramas (secuencias de bases nucleotídicas) por muestra: uno correspondiente a la hebra molde y otro correspondiente a la hebra complementaria. Se revisa la calidad de la secuencia mediante el software FinchTV (Figura III.6) y, posteriormente, se alinean y ensamblan las secuencias directa y reversa mediante el software FASTA Sequence Comparison© (disponible en la web <https://fasta.bioch.virginia.edu/>) para obtener una única secuencia consenso. Esta secuencia consenso se compara con las secuencias que se encuentran en la base de datos

GenBank (disponible en la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este programa, mediante la herramienta informática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), compara la secuencia introducida con su base de datos y proporciona una lista de las secuencias con el mayor porcentaje de identidad y similitud. Una vez analizadas las secuencias, se registran en el propio banco de secuencias del NCBI.

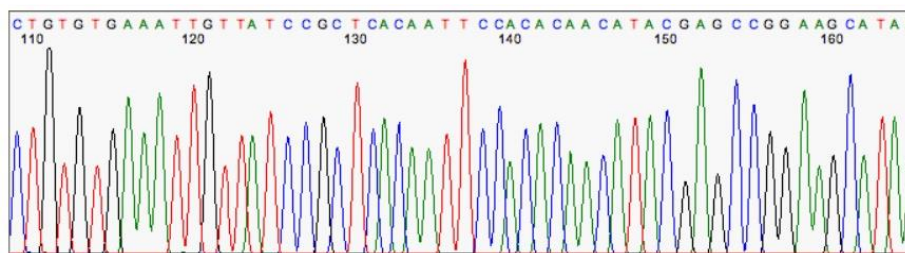


Figura III.6. Electroferograma de una secuencia amplificada con los cebadores JDP visualizado mediante el Software FinchTV.

1.5.4. Análisis filogenético

El análisis filogenético permite convertir la información de secuencias de nucleótidos en un árbol evolutivo; para ello, se emplea el Software informático MEGA11 (Tamura y col., 2021). Mediante la herramienta ClustalW, se alinean las secuencias de *Acanthamoeba* obtenidas y se recortan de forma que se comparen secuencias de la misma longitud (pares de bases). Posteriormente, se infiere el árbol filogenético a partir del alineamiento de las secuencias. Este proceso puede realizarse mediante diferentes métodos. En el presente trabajo, se emplea el método basado en matrices de distancias *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987), con 1000 pseudoréplicas, el cual trata de identificar el árbol filogenético que presenta una menor longitud de sus ramas. La distancia evolutiva se calcula mediante el método p-distancia (Nei y Kumar, 2000) según el número de diferencias en las pares de bases por sitio; las posiciones ambiguas se eliminan para cada par de secuencias. Una vez obtenido el árbol filogenético, se analiza el nivel de confianza de cada nodo, aceptando aquellos con un valor de confianza igual o superior al 50 % y colapsando los nodos con menor nivel de confianza (Martínez y González, 2004; López, 2017). Para calcular la matriz de identidades a partir del alineamiento de las secuencias, se emplea el Software informático BioEdit v.7.7.1.

Adicionalmente, para conocer el genotipo de las secuencias de *Acanthamoeba* obtenidas, se realiza un análisis filogenético de dichas secuencias, junto con las secuencias de *Acanthamoeba* de referencia correspondientes a los diferentes genotipos descritos hasta la fecha. Estas

secuencias de referencia se obtienen a partir de la base de datos GeneBank, disponible en la página web del NCBI. La lista de secuencias de referencia se muestra en la Tabla III.5. La secuencia de referencia del genotipo T22 no se ha empleado para el estudio filogenético debido a no estar disponible la secuencia de interés.

Tabla III.5. Secuencias de *Acanthamoeba* de referencia empleadas para el análisis filogenético y determinación de genotipo de las secuencias obtenidas.

GENOTIPO	ESPECIE DE ACANTHAMOEBA	REFERENCIA GENE BANK
T1	<i>A. castellanii</i> CDC:0981:V006	U07400
T2	<i>A. palestinensis</i> Reich ATCC30970	U07411
	<i>A. polyphaga</i> CCAP:1501/3c	AF019051
T3	<i>A. griffini</i> H37	S81337
	<i>A. griffini</i> S-7	U07412
	<i>A. polyphaga</i> Panola Mt.	AF019052
	<i>A. griffini</i> Sawyer ATCC50435	AF019053
	<i>A. castellanii</i> Castellani ATCC50374	U07413
T4	<i>A. castellanii</i> ATCC50370	U07414
	<i>A. castellanii</i> ATCC5049	U07401
	<i>A. castellanii</i> ATCC50493	U07403
	<i>A. castellanii</i> CDC:180:1	U07405
	<i>A. castellanii</i> Neff ATCC50373	U07416
	<i>A. culberstoni</i>	AF019057
	<i>A. hatchetti</i> 2AX1	AF019060
	<i>A. lugdunensis</i> ATCC50371	U07407
	<i>A. polyphaga</i> ATCC50372	U07415
	<i>A. polyphaga</i> CDC:0884:V029	U07402
	<i>A. polyphaga</i> HC-2	AF019056
	<i>A. polyphaga</i> Nagington ATCC30873	AF019062
	<i>A. rhyodes</i> ATCC30973	U07417
	<i>A. rhyodes</i> ATCC50368	U07406
	<i>Acanthamoeba</i> sp. Fernandez ATCC50369	U07409
T5	<i>A. lenticulata</i> ATCC50703	U94730
	<i>A. lenticulata</i> PD2S ATCC30841	U94741
T6	<i>A. palestinensis</i> ATCC50708	AF019063
T7	<i>A. astronyxis</i> Ray & Hayes ATCC30137	AF019064
T8	<i>A. tubiashi</i>	AF019065
T9	<i>A. comandoni</i> Comandon & de Fonbrune ATCC30135	AF019066
T10	<i>A. culbertsoni</i> CDC:V409C	DQ499151
T11	<i>A. stevensoni</i> ATCC50388	AF019069
	<i>A. hatchetti</i> BH-2	AF019068
T12	<i>A. healyi</i>	AF019070

Tabla III.5. Secuencias de *Acanthamoeba* de referencia empleadas para el análisis filogenético y determinación de genotipo de las secuencias obtenidas. *Continuación.*

GENOTIPO	ESPECIE DE ACANTHAMOEBA	REFERENCIA GENE BANK
T13	<i>Acanthamoeba</i> sp. UWET39	AF132136
	<i>Acanthamoeba</i> sp. UWC9	AF132134
T14	<i>Acanthamoeba</i> sp. PN13	AF333609
T15	<i>A. jacobsi</i> ATCC 30732	AY262360
T16	<i>Acanthamoeba</i> sp. cvX	GQ380408
	<i>Acanthamoeba</i> sp. U/H-C1	AY026245
T17	<i>Acanthamoeba</i> sp. Ac_E9a	GU808301
T18	<i>A. byersi</i> CDC:V621	KC822461
T19	<i>A. micheli</i> T19	KJ413084
	<i>Acanthamoeba</i> sp. T19	KP711387
T20	<i>Acanthamoeba</i> sp. T20	DQ451161
T21	<i>A. pyriformis</i> T21	KX840327
T23	<i>Acanthamoeba</i> sp. T23	MZ272148
	<i>Acanthamoeba</i> sp. T23	MZ272149

2. EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO, CONSERVACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ENDOCITOBIONTES A PARTIR DE AMEBAS DE VIDA LIBRE

2.1. CEPAS DE ESTUDIO

La extracción de bacterias endocitobiontes se realiza a partir de una selección de cultivos de amebas en PPYG capaces de crecer en medio axénico; para ello, se determina periódicamente la concentración de amebas de vida libre presente en los cultivos axénicos (conservados en medio PPYG e incubados a 30 °C) mediante la técnica de recuento por hemocitómetro (Apartado III.1.4.1) y se seleccionan aquellos que alcanzan una concentración de al menos 10^5 células/mL.

2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Medio Müller Hinton (MH)

Se trata de un medio nutritivo que permite el crecimiento de un gran número de microorganismos sin requerimientos particulares. Su preparación se realiza siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Scharlab S.L., Barcelona, España). Al suplementar el medio MH con antibióticos, se selecciona el crecimiento de bacterias resistentes al antibiótico y concentración en cuestión. Para su preparación, se añade una solución concentrada del antibiótico de interés antes de dispensar el medio ya autoclavado y atemperado en las placas Petri. Los antibióticos empleados (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y su concentración final en MH se indican en la Tabla III.6. Para la preparación de las soluciones concentradas de apramicina y gentamicina, se emplea agua destilada estéril; para la preparación de las soluciones concentradas de ampicilina y cloranfenicol, se emplea tampón fosfato 0,1 M a pH 6 y etanol al 35 %, respectivamente. En el caso de ciprofloxacina, la solución concentrada se prepara en medio básico.

Medio Agar Sangre (AS)

Se trata de un medio muy nutritivo empleado para el aislamiento de cepas bacterianas ya que contiene sangre ovina y permite que las colonias bacterianas sean más grandes y el crecimiento más abundante que en otros medios. Las placas de Petri de AS se obtienen directamente preparadas para su uso por el fabricante (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Medio LB (Luria Bertani)

Se trata de un medio de cultivo líquido enriquecido, especialmente empleado para el crecimiento de bacterias. Su preparación se realiza siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Labbox Labware, Barcelona, España).

Tabla III.6. Antibióticos y concentraciones empleados para el aislamiento de bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos.

ANTIBIÓTICO	FAMILIA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	Betalactámicos	50
Apramicina	Aminoglucósidos	16
Gentamicina	Aminoglucósidos	16
Cloranfenicol	Fenicoles	50
Ciprofloxacina	Fluoroquinolonas	8

2.3. EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN

El aislamiento de bacterias endocitobiontes se realiza en placas de Petri con medio Müeller Hinton (MH) con y sin antibiótico. Para ello, en primer lugar, se prepara un concentrado de la ameba de interés centrifugando entre 1 y 3 mL del medio líquido de cultivo en eppendorfs estériles a 6000xg durante 10 minutos. Posteriormente, se descarta el sobrenadante y se resuspende (lava) el precipitado con suero fisiológico estéril (SFE). Se realizan tres centrifugaciones y lavados consecutivos del precipitado con SFE.

Una vez obtenido el precipitado con el concentrado de la AVL de estudio, se determina la concentración de AVL mediante la técnica de recuento por hemocitómetro (Apartado III.1.4.1). Posteriormente, se añaden entre tres y cinco bolitas de zirconio y se agita el eppendorf con un vórtex durante 3 minutos. A continuación, se inocula el volumen necesario sobre cada placa de MH con y sin antibiótico de forma que se inoculen al menos 10^5 células por placa; el volumen se distribuye mediante un asa de Digrafsky y las placas se incuban durante 24-48 horas a 37 °C. Transcurrido el período de incubación, se cuentan las colonias crecidas y se resiembran en nuevas placas MH.

Si el concentrado de AVL no es suficiente para inocular la suficiente cantidad de células en las seis placas de MH (una sin antibiótico y cinco con antibiótico), se inocula en MH y, posteriormente, se resiembran las colonias crecidas en placas MH con antibiótico para seleccionar las que sí crezcan en estos medios selectivos.

Una vez extraídas las cepas bacterianas endocitobiontes, se siembran por agotamiento por estrías en agar sangre (Figura III.7) para su aislamiento (Díaz y col., 1995). Estas cepas se conservan a -20 °C en viales con leche descremada, esterilizada a vapor fluente.

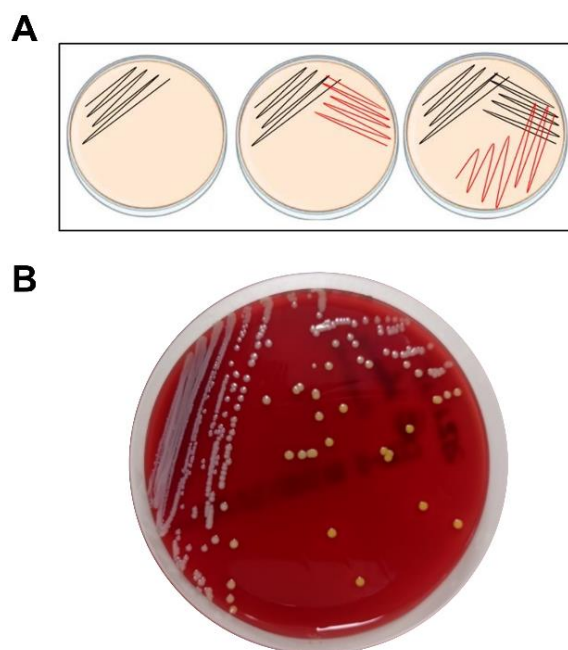


Figura III.7. Siembra por agotamiento. A. Procedimiento de la siembra (figura adaptada de Journal Club of Biotechnology, 2022). B. Colonias aisladas de *Staphylococcus warneri* en AS mediante la técnica de siembra por agotamiento.

2.4. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MALDI-TOF

Fundamentos de la técnica

La espectrometría de masas MALDI-TOF, denominada así por sus siglas en inglés “matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”, es una técnica utilizada en la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas, el cual, es único para cada especie. El espectro obtenido para un determinado microorganismo se compara automáticamente con la base de datos y, el resultado, se emite junto a un puntaje o “score” en función de la similitud.

Este sistema constituye una herramienta útil para el laboratorio microbiológico, pues permite una identificación rápida de bacterias y levaduras a partir de colonias aisladas e, incluso, es capaz de diferenciar a nivel de subespecie.

Preparación de la muestra

Partiendo de un cultivo fresco (crecido durante las últimas 24 horas), se toma con una punta de pipeta estéril una colonia de la cepa a analizar. En uno de los pocillos de la placa metálica de 96 pocillos del equipo, se extiende la muestra y se añade 1 μ L de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Se deja secar la muestra hasta que cristaliza y forma un depósito sólido de muestra embebida en la matriz (Figura III.8). Esta matriz es esencial ya que proporciona los protones necesarios para ionizar la muestra. Como control se utiliza una cepa ya identificada y con el espectro proteico ya registrado en el equipo de MALDI-TOF MS: *Escherichia coli* ATCC 25922.

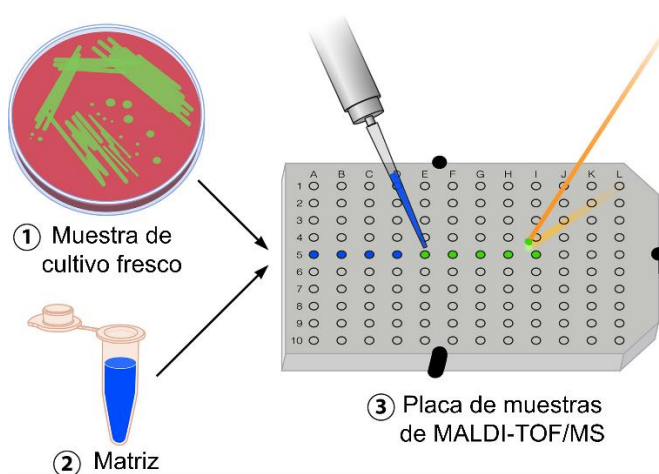


Figura III.8. Esquema general para la preparación de las muestras bacterianas a identificar mediante MALDI-TOF MS. Figura adaptada de Clark y col. (2013).

Análisis

Para la identificación de las cepas bacterianas se emplea el equipo MALDI-TOF microflex Bruker Daltonics® (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Este equipo irradia un pequeño punto de la muestra (entre 0,05 y 0,2 mm de diámetro) mediante un láser ultravioleta durante un corto periodo de tiempo (para evitar el daño o degradación de la muestra). Las moléculas de la matriz, al absorber la energía del rayo (los fotones), se subliman y se ioniza la muestra.

Una vez ionizadas, las proteínas se analizan por espectrometría de masas, revelando información sobre la composición de las muestras mediante un espectro de ratios de masa-carga (m/z) característico. Estas ratios son medidas electrodinámicas de cuán rápido se mueven los iones cargados (o el tiempo de vuelo, “time of flight” o TOF en inglés) desde la muestra hasta el detector.

Mediante el software Bruker Daltonics flexControl versión 3.4 se genera un espectro para cada muestra. El software compara con una base de datos de espectros de referencia, permitiendo la identificación microbiana. Como la composición proteica difiere para cada especie bacteriana (e incluso entre cepas y subespecies), se generan diferentes espectros, permitiendo la discriminación entre organismos emparentados cercanos.

Tras la comparación del espectro de la muestra diana y los espectros de la base de datos, el software puntúa de 0 a 3 000 la similitud a los mismos y los ordena de mayor a menor puntuación. Clasifica cada identificación como “identificación a nivel de especie altamente probable”, “identificación segura a nivel de género y probable a nivel de especie”; “identificación probable a nivel de género”, “identificación no confiable”. Tras analizar las identificaciones con mayor puntuación, se concluye el género e, idóneamente, la especie de la cepa diana (Figura III.9).

Debido a que el equipo MALDI-TOF MS se ha desarrollado como una técnica para la identificación rutinaria en clínica, la base de datos del equipo está incompleta, al poseer especialmente espectros de especies bacterianas de interés clínico (Clark y col., 2013).

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Staphylococcus pasteurii DSM 10657 DSM	2.409	45972
2 (++)	Staphylococcus pasteurii 110706_L1 LUMC	2.166	45972
3 (++)	Staphylococcus pasteurii CCUG 48128 CCUG	2.098	45972
4 (++)	Staphylococcus warneri CCUG 39229 CCUG	2.052	1292
5 (++)	Staphylococcus pasteurii DSM 30796 DSM	2.04	45972
6 (+)	Staphylococcus pasteurii CCUG 32422 CCUG	1.962	45972
7 (+)	Staphylococcus warneri DSM 30728 DSM	1.917	1292
8 (+)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 3463 DSM	1.878	46170
9 (+)	Staphylococcus warneri DSM 20316T DSM	1.852	1292
10 (+)	Bacillus endophyticus DSM 13796T DSM	1.84	135735

Figura III.9. Extracto del resultado obtenido mediante análisis por MALDI-TOF MS de una cepa bacteriana identificada como *Staphylococcus pasteurii*.

3. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA Y LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LAS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

3.1. CEPAS DE ESTUDIO

La evaluación de la resistencia a antibióticos se realiza sobre una selección de 130 bacterias endocitobiontes extraídas y aisladas a partir de las AVL de estudio. Esta colección de cepas bacterianas agrupa, por un lado, a aquellas que se aíslan directamente en medio selectivo con antibiótico y, por otro, a aquellas que presentan una morfología diferente entre las aisladas en medio no selectivo.

Para el estudio de la resistencia a antibióticos, se emplean las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, tal y como indican las metodologías estandarizadas del Comité Europeo de Estudio de la Susceptibilidad a Antimicrobianos o EUCAST por sus siglas en inglés (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, 2024) y del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio o CLSI por sus siglas en inglés (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2015).

Una vez conocido el perfil de resistencias a antibióticos de las bacterias endocitobiontes, se evalúa la presencia de integrones en aquellas cepas que muestran resistencia al menos a uno de los antibióticos evaluados.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y EVALUACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIAS

3.2.1. Antibiograma disco-placa

El antibiograma disco-placa o por difusión de disco es un método comúnmente empleado para la evaluación de la sensibilidad de las cepas bacterianas a diferentes antibióticos. Esta técnica consiste en depositar discos de papel impregnados con el antibiótico en cuestión sobre una placa de MH previamente inoculada con el microorganismo de estudio. Al ponerse en contacto, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar, formándose un gradiente de concentración radial. Transcurridas entre 18 y 24 horas, la cepa bacteriana crece en la placa y, en función de su sensibilidad al antibiótico de estudio, lo hace a una mayor o menor distancia del disco de antibiótico. De esta manera, se observa un halo de inhibición (Figura III.10) cuyo diámetro se

mide (en mm) y se relaciona con la sensibilidad o resistencia de la cepa al antibiótico de estudio (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC, 2000a).



Figura III.10. Antibiograma de la cepa *Staphylococcus warneri* C1-2121.

En el presente trabajo, los antibiogramas disco-placa se realizan siguiendo el protocolo estandarizado del método de difusión de disco recomendada por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2015), utilizando como control las cepas de referencia indicadas en el Apartado III.3.1.

Adicionalmente, y siguiendo las indicaciones proporcionadas por las guías de la SEIMC (2011) y el EUCAST (2024), se realizan pruebas de *screening* con el antibiótico norfloxacinó para la detección de resistencia a fluoroquinolonas en las cepas de *Bacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. También se realizan pruebas específicas de detección de resistencia a meticilina (midiendo el halo de inhibición a cefoxitina) y a los antimicrobianos MLS_B (macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B) para las cepas aisladas de *Staphylococcus* spp. Esta última resistencia se evalúa mediante la prueba “D”, en la que se colocan los discos de eritromicina y clindamicina a una distancia entre 12 y 20 mm y se observa la aparición o no de achatamiento del halo de la clindamicina (por influencia de la presencia de eritromicina).

Antibióticos de estudio

Se evalúa la sensibilidad y resistencia a un panel de antibióticos que incluye al menos un componente de las familias más frecuentemente utilizados. Se evalúa además la sensibilidad a una serie de antibióticos indicados para determinados géneros bacterianos en los casos pertinentes. Los antibióticos analizados y sus concentraciones se indican en la Tabla III.7.

Adicionalmente, se estudia el perfil completo de resistencia a aminoglucósidos a una selección de cepas con los fenotipos de resistencia a esta familia de mayor interés. Los aminoglucósidos analizados y sus concentraciones se indican en la Tabla III.8.

Tabla III.7. Antibióticos empleados para la evaluación de resistencia de las bacterias endocitobiontes.

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ABREVIATURA	CARGA (µg)
Aminoglucósidos	Apramicina†	AP	15*
	Estreptomicina†	ST	10
	Gentamicina†	GM	10
	Higromicina†	H	15*
	Kanamicina†	K	30
Anfenicoles	Cloranfenicol†	CL	30
Betalactámicos carbapenems	Imipenem	IMI	10
	Meropenem	MEM	10
Betalactámicos cefalosporinas	Cefepima	FEP	30
	Cefoxitina	FOX	30
	Ceftriaxona†	CRO	30
	Ceftazidima	CAZ	30
Betalactámicos monobactámicos	Aztreonam	ATM	30
Betalactámicos penicilinas	Ampicilina†	AMP	10
	Oxacilina†	OX	1
	Penicilina	PEN	10
	Piperacilina	PIP	100
Diaminopirimidinas/ Sulfonamidas	Trimetoprim/Sulfametoxazol†	SXT	25
Lincosamidas	Clindamicina	CC	2
Macrólidos	Azitromicina†	AZM	15
	Eritromicina†	E	15
Quinolonas	Ácido Nalidíxico†	NAL	30
	Ciprofloxacino†	CIP	5
	Norfloxacina	NOR	10
Rifamicinas	Rifampicina†	RA	30
Tetraciclinas	Minociclina†	MNO	30
	Tetraciclina	TET	30

*Discos preparados manualmente. †Antibióticos del panel general.

Preparación de discos de antibióticos

Los discos de antibióticos empleados pueden ser adquiridos por casas comerciales o preparados en el laboratorio. En las Tablas III.7 y III.8 se indica con un asterisco (*) aquellos discos que se preparan manualmente en el laboratorio. Para ello, se preparan soluciones de los antibióticos de interés y se añade el volumen necesario para obtener la cantidad de antibiótico (μg) o carga deseada. Este proceso se realiza en condiciones asépticas y, sobre una placa de Petri vacía y estéril que actúa como soporte y almacén. Posteriormente, se incuban a 37 °C durante unos minutos para secarlos. Una vez preparados, los discos se conservan en refrigeración (a 4 °C) hasta su posterior uso.

Tabla III.8. Antibióticos aminoglucósidos empleados para la evaluación de resistencia de las bacterias endocitobiontes.

ANTIBIÓTICO	ABREVIATURA	CARGA (μg)
Amikacina	AK	15*
Dibekacina	DK	15*
Neomicina	NM	15*
2'-etil netilmicina	2'NET	15*
Paromomicina	PM	15*
Sisomicina	SIS	15*
Espectinomicina	SPC	15*
Gentamicina B	GM _B	15*
Gentamicina C1	GM _{C1}	15*
Gentamicina C1A	GM _{C1A}	15*
Gentamicina C2	GM _{C2}	15*
Kanamicina A	K _A	15*
Kanamicina B	K _B	15*

*Discos preparados manualmente

3.2.2. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

Concentración mínima inhibitoria

Se entiende por concentración mínima inhibitoria (CMI) la concentración mínima que provoca la inhibición de crecimiento bacteriano. Para determinar este parámetro para un determinado antibiótico y cepa bacteriana, se determina el crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico diluido en medio de cultivo líquido. Para ello, se preparan diluciones seriadas a la mitad y se determina qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo (SEIMC, 2000a). La mínima concentración de antibiótico a la que no se observa crecimiento bacteriano se considera la CMI.

Concentración mínima bactericida

La concentración mínima bactericida (CMB) es la concentración mínima que causa la muerte de la bacteria de estudio. Para determinar este parámetro para un determinado antibiótico y cepa, se parte de los cultivos en dilución realizados para determinar la CMI y se realiza un subcultivo de las diluciones en las que se ha inhibido el crecimiento, en medio sin antimicrobiano. Se evalúa el crecimiento bacteriano o su ausencia tras 24 horas de incubación. Los subcultivos con crecimiento, corresponden a concentraciones bacteriostáticas, mientras que se considera la CMB a la mínima concentración en que no se observa crecimiento posterior (SEIMC, 2000a,b).

En el presente estudio se determina la CMI y la CMB de apramicina, higromicina, gentamicina y estreptomycinina a una selección de cepas de bacterias endocitobiontes que presentan los perfiles de resistencia a aminoglucósidos de mayor interés. Los rangos de concentración evaluados son: desde 2 mg/L hasta 1024 mg/L para apramicina e higromicina y desde 0,5 mg/L hasta 256 mg/L para gentamicina y estreptomycinina. La CMI se determina empleando el medio de cultivo líquido BH y, la CMB, inoculando muestra de las diluciones con crecimiento inhibido sobre medio MH. Ambos parámetros se determinan siguiendo las indicaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC, 2000a, b).

3.2.3. Clasificación R/I/S

Una vez obtenidos los diámetros de los halos de inhibición del antibiograma disco-placa y las CMI para las bacterias endocitobiontes estudiadas, se comparan estos valores con las tablas de la guía del Comité Europeo de Estudio de la Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST, 2024). Este comité establece unos puntos de corte clínicos específicos para géneros y especies bacterianas que actualiza y revisa cada año. Estos puntos de corte sirven para categorizar los microorganismos en tres categorías de susceptibilidad:

- **Susceptible (S)** a un régimen estándar de dosis cuando hay probabilidades de éxito terapéutico
- **Susceptible, exposición aumentada (I):** hay probabilidad de éxito terapéutico si se aumenta la dosis
- **Resistente (R):** hay una alta probabilidad de fallo terapéutico incluso aumentando la dosis

Debido a que las bacterias endocitobiontes aisladas en el presente trabajo son de origen ambiental y las guías del EUCAST están especialmente diseñadas para el análisis en casos

clínicos, este proceso se complementó con las guías establecidas por el Instituto (estadounidense) de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2015, 2020), en las que se facilita información para géneros menos frecuentes en casos clínicos. Para aquellos antibióticos no presentes en las guías, se toma un diámetro de 15 mm de halo de inhibición como punto de corte tal y como se realiza en otros estudios (Costa y col., 2021; Pekala y col., 2018; Sharma y col., 2013) e indica la guía de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC, 2000a).

3.2.4. Índice MRA

El índice de multirresistencia a antibióticos o índice MRA (también conocido como índice MAR por sus siglas en inglés “Multi-Antibiotic Resistance”), se utiliza para determinar si las bacterias de estudio han estado expuestas a entornos con alta presión antibiótica. Este índice se calcula dividiendo el número de antibióticos a los que la bacteria es resistente por el total de antibióticos evaluados. Valores del índice MRA superiores a 0,2 indican que la bacteria procede de ambientes con alta presión antibiótica, mientras que valores inferiores a 0,2 sugieren una procedencia de ambientes con baja presión antibiótica (Adamski y col., 2023).

3.3. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE INTEGRONES

Una vez analizada la susceptibilidad y resistencia de las bacterias endocitobiontes al panel de antibióticos general y específico de aminoglucósidos, se estudia la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3. Para ello se evalúa la presencia y amplificación de los genes *int1*, *int2*, *int3* que codifican para las integrasas 1, 2 y 3, respectivamente. En total, se evalúa la presencia de integrones de 120 cepas bacterianas.

Los cebadores, concentraciones de los reactivos y las condiciones de las PCR empleados para detectar la presencia de integrones se describen en las Tablas III.9 y III.10. El procedimiento para llevar a cabo la electroforesis, en este caso al 1 % de agarosa, y la visualización de los productos de PCR se realiza tal y como se indica en el Apartado 1.5.2 del presente capítulo.

La observación de cepas positivas para estas PCR supone la existencia de integrones capaces de incorporar casetes genéticos (Ruíz, 2007). Para caracterizar estos casetes, se han de realizar PCR que permitan amplificarlos, las cuales dependen de la clase de integrón que presente la cepa. De esta forma, todas las muestras que resultan positivas para la presencia de integrones de clase 1, se someten a una segunda PCR para evaluar la presencia de casetes internos empleando los

cebadores 5'CS-F y 3'CS-R y, en el caso de resultar positiva la PCR para la presencia de integrones de clase 2, se realiza una segunda PCR empleando los cebadores ATT12-F y ORFX-R. Se siguen las condiciones de preparación de la mezcla de reacción y desarrollo de la PCR indicados en las Tablas III.9 y III.10. Se realiza la electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % siguiendo las instrucciones del Apartado III.1.5.2 y, de resultar positivas alguna de estas segundas amplificaciones, se repite la PCR con un mayor volumen. El producto se purifica y se envía para su secuenciación al Servicio de Secuenciación del IACS de la Universidad de Zaragoza, tal y como se indica en el Apartado 1.5.3 del presente capítulo. En el caso de resultar positivas las PCR para la presencia de integrones de clase 3, no se realiza ningún estudio posterior al no existir todavía información metodológica al respecto.

Tabla III.9. Concentración final de los reactivos en las mezclas de reacción de las PCR empleadas para la detección de integrones y la caracterización de las regiones variables internas.

COMPUESTO	INT 1/2/3	CS / ATT12-ORFX
Tampón de reacción	1x	1x
MgCl₂	1,5 mM	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 μM
Cebador^a	2 μM	1 μM
Taq polimerasa	0,06 U/μL	0,03 U/μL
Volumen ADN:mezcla	11:25	1:25

^a*Microsynth AG. (Balgach, Suiza).*

Estudio de las secuencias obtenidas

Una vez obtenidas las secuencias de las regiones variables internas de los integrones, se revisa la calidad de los electroferogramas y se alinean y ensamblan las secuencias directa y reversa como se indica en el Apartado 1.5.3 del presente capítulo para obtener una única secuencia consenso, si es posible. Se realiza una comparación de la secuencia consenso o, en su defecto, de las secuencias directa y reversa por separado, en la base de datos GenBank del NCBI mediante la herramienta informática BLAST. Una vez obtenidos los resultados comparativos y, atendiendo a la posición de los nucleótidos de la secuencia emparejada con la secuencia diana, se busca en el genoma del microorganismo emparejado el contenido del casete para identificar la función de la secuencia amplificada del integrón.

Tabla III.10. Secuencia de los cebadores, tamaño de los productos (pb) y programas de PCR empleados para la detección de integrones y la caracterización de las regiones variables internas de los integrones (Firoozeh y col., 2019).

IDENTIFICACIÓN	CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5' – 3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO	CICLOS DEL PROGRAMA					
				C1	C2		C3	C4	
<i>intl 1</i>	INTI 1-F	TCTCGGGTAACATCAAGG	254	94 °C 5 min	35 ciclos				4 °C
	INTI 1-R	AGGAGATCCGAAGACCTC			94 °C 1 min	55 °C 1 min	72 °C 30 s	72 °C 10 min	
<i>intl 2</i>	INTI 2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGG	788	94 °C 5 min	45 ciclos				4 °C
	INTI 2-R	TGTAGCAAACGAGTGACGAAATG			94 °C 1 min	60 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 10 min	
<i>intl 3</i>	INTI 3-F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	600	94 °C 5 min	35 ciclos				4 °C
	INTI 3-R	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG			94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 10 min	
<i>5'CS</i> <i>3'CS</i>	5'CS-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	>500	94 °C 5 min	35 ciclos				4 °C
	3'CS-R	AAGCAGACTTGACCTGA			94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 10 min	
<i>attI2</i> <i>orfX</i>	ATTI2-F ORFX-R	GACGGCATGCACGATTTGTA	>500	94 °C 12 min	35 ciclos				4 °C
		GATGCCATCGCAAGTACGAG			94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 3,5 min	72 °C 10 min	

4. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN PARA INACTIVAR ACANTHAMOEBA Y SUS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

4.1. CEPAS DE ESTUDIO

Se estudian dos cepas de *Acanthamoeba* spp.: *Acanthamoeba* P31 (Nº de acceso a GenBank KY038362), aislada de agua recreacional de una piscina abierta de Zaragoza (Ortillés y col., 2017) y *Acanthamoeba* C1-211 (Nº acceso a Genbank OQ927217), aislada del río Noguera Ribagorzana en el municipio de Lérida, tal y como se describe en el Apartado 1 del presente capítulo. Estas AVL se incuban en medio PPYG a 30 °C durante varias semanas hasta obtener elevadas concentraciones de cada ameba (en torno a 10^6 amebas/mL).

Las cepas seleccionadas son cepas de *Acanthamoeba* de crecimiento rápido: capaces de proliferar abundantemente en agar no nutritivo cubierto con *E. coli* inactivada tras 7 días de incubación a 30 °C (Figura III.11).

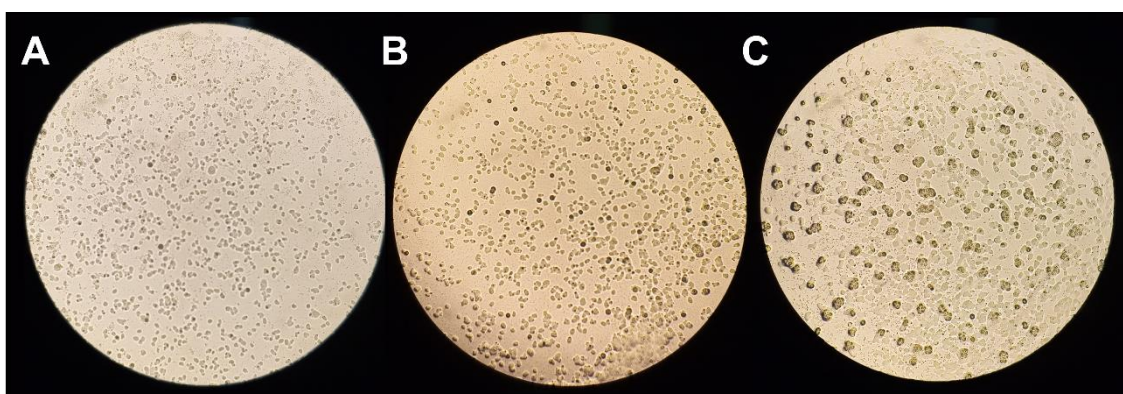


Figura III.11. Crecimiento de *Acanthamoeba* C1-211 en ANN con *E. coli* tras (A) 3, (B) 5 y (C) 7 días de incubación a 30 °C. Microscopia óptica (10x).

4.2. AGENTES DE DESINFECCIÓN, CONCENTRACIÓN RESIDUAL Y DOSIS DE DESINFECTANTE

Se evalúan siete tratamientos de desinfección diferentes: cloración (Cl_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radiación solar en el rango de 320 a 800 nm ($\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$), radiación solar en el rango de 280 a 800 nm ($\text{RS}_{280-80 \text{ nm}}$), combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ ($\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$), combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{280-800}$ ($\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$), combinación de H_2O_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$).

4.2.1. Hipoclorito sódico

En los ensayos de desinfección de cloración (Cl_2) y su combinación con radiación solar ($\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800\text{ nm}}$ y $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800\text{ nm}}$), se evalúa la efectividad del cloro adicionando diferentes dosis de una disolución de hipoclorito sódico de Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España), al 10% (m/v). Tras el ensayo, se determina el cloro residual utilizando dos metodologías diferentes; para concentraciones superiores a 5 mg/L, la microtitulación con tiosulfato de sodio y, para concentraciones inferiores a 5 mg/L, el método de la N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD).

Microtitulación con tiosulfato sódico

El cloro se puede cuantificar por volumetría mediante titulación con tiosulfato sódico usando almidón como indicador. Esta técnica mide el cloro libre (ion hipoclorito, ácido hipocloroso), el cual, al reaccionar con yoduro de potasio a pH ácido libera yodo libre. Este yodo libre (agente oxidante) puede reducirse al añadir una solución estándar de tiosulfato de sodio (agente reductor). Cuando todo el yodo liberado ha reaccionado, el tiosulfato en exceso (no oxidado) se puede determinar utilizando almidón (añadido previamente a la solución), el cual, actúa como indicador ya que cambia de color marrón a azul al reaccionar con el exceso del tiosulfato (International Organization for Standardization, ISO, 1990). Debido a que en los ensayos de desinfección realizados se trabaja con volúmenes en el rango de mili- y microlitros, se adapta la metodología descrita por Eaton y col. (2005) a volúmenes en el rango de microlitros.

Método DPD

La concentración de cloro se determina mediante espectrofotometría tras reaccionar el cloro con el colorante N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD). El cloro (ácido hipocloroso e iones hipoclorito) y las cloraminas liberan yoduro al reaccionar con yoduro de potasio a pH inferior a 4. El yoduro liberado reacciona con el compuesto DPD y produce una solución roja. La intensidad del color está directamente relacionada con la concentración de cloro presente en la solución.

Para el presente estudio, se adapta la metodología descrita por la Asociación de Protección Ambiental de Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA, 1983) a volúmenes en el rango de los microlitros y se utiliza el kit comercial “Free chlorine reagent set (A+B)” de Hannah Instruments (Eibar, España) que incluye los reactivos necesarios para que la muestra de estudio, en presencia de cloro libre, se colorea de un tono rosado. Tras la coloración, se mide la absorbancia de la muestra a 515 nm con un espectrofotómetro Jenway™ 6305 UV/visible de Fisher Scientific S.L. (Madrid, España) y, posteriormente, se calcula la concentración de cloro

residual presente en cada muestra extrapolando mediante una recta de calibrado previamente determinada con el Software Excel 2023.

Cálculo de la dosis de exposición a cloro: el valor CT

La exposición a un desinfectante químico se puede cuantificar mediante el valor CT, definido según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, 1999) como el producto de la concentración residual de desinfectante ($C_{residual}$ en mg/L) y el tiempo de contacto (t en s), tal y como indica la Ecuación III.2. Se emplea especialmente para cuantificar la exposición al cloro, en mgmin/L, pero puede emplearse para cuantificar la exposición a otros desinfectantes.

Ecuación III.2.
$$CT \text{ (mgmin/L)} = C_{residual} \times t$$

4.2.2. Peróxido de hidrógeno

Los ensayos de desinfección se realizaron adicionando diferentes dosis de una solución 30 % v/v de peróxido de hidrógeno de Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España), sobre la muestra de estudio.

La concentración de peróxido de hidrógeno residual se determina mediante espectrofotometría. Este método se basa en la reacción de H_2O_2 con metavanadato de amonio en medio ácido, que resulta en la formación de un catión de peroxovanadio de color naranja-rojizo, con absorbancia máxima a 450 nm. Para el presente estudio, se adapta la metodología descrita por Nogueira y col. (2005) y Terán (2016) y se mide la absorbancia a 450 nm de las muestras de interés mediante un espectrofotómetro Jenway™ 6305 UV/visible de Fisher Scientific S.L. La concentración de H_2O_2 presente en las muestras se calcula extrapolando mediante una recta de calibrado previamente determinada (Software Excel 2023).

4.2.3. Radiación solar

Los ensayos de radiación solar se realizan en una cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+ (Ametek. Inc., Illinois, Estados Unidos) provista de una lámpara de xenón. Este sistema reproduce la luz natural del sol en condiciones de laboratorio, emitiendo luz en las longitudes de onda de 280 a 800 nm (incluyen radiación UV-B, UV-A y visible). Se emplea un filtro de cuarzo y un filtro de vidrio Xenochrome 320 (Ametek. Inc.) en los experimentos en los que se necesita que se absorban las longitudes de onda inferiores a 320 nm, de forma que el rango de trabajo sea de

320 a 800 nm (incluye radiación UV-A y visible), tal y como muestra el espectro de emisión de la Figura III.12. Estos rangos representan la exposición directa a radiación solar (280-800 nm) y la exposición a radiación solar a través de un reactor de vidrio o plástico, como en un reactor SODIS (320-800 nm).

Todos los ensayos se realizan con una intensidad de luz de 500 W/m^2 , que corresponde al 50 % de la intensidad de radiación solar que llega al Ecuador al mediodía (Yuranova y col., 2004). Se mantiene la temperatura por debajo de 30°C durante los experimentos para que sólo esté implicada la radiación solar (y no el calentamiento) en los procesos de desinfección.

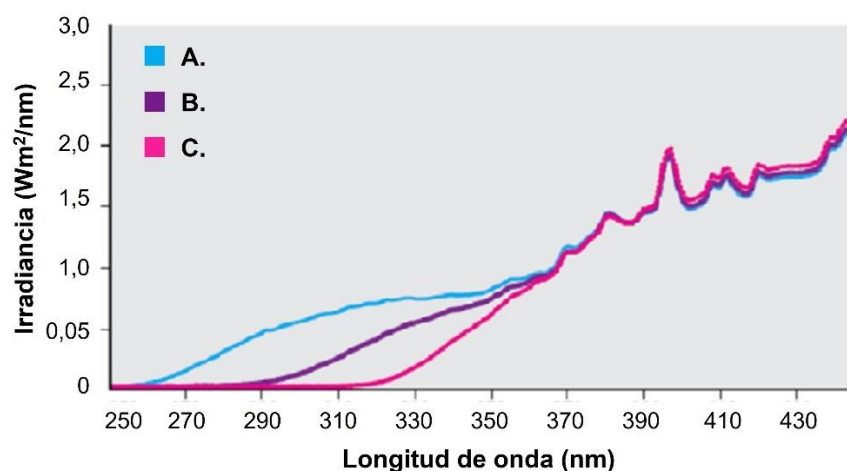


Figura III.12. Radiometría de la luz solar y lámpara de xenón de la cámara solar. Espectro (A.) natural y simulado (B.) sin filtro de vidrio, (C.) con filtro de vidrio. Figura adaptada de Valero (2017).

Cálculo de la dosis de exposición a radiación solar: intensidad de radiación

La exposición a radiación solar o radiación ultravioleta se cuantifica mediante la dosis de radiación. Si la intensidad de radiación aplicada es constante a lo largo del tiempo, la dosis de radiación (D) puede calcularse como el producto de la intensidad (I) y el tiempo de exposición (t en s), tal y como indica la Ecuación III.3 (EPA, 1999; Hijnen y col., 2006). Dependiendo de la fuente de radiación suelen emplearse diferentes unidades para la intensidad de la radiación: mJ/cm^2 en el caso de lámparas de radiación UV y W/m^2 en el caso de radiación solar.

Ecuación III.3.
$$D (\text{Ws}/\text{m}^2) = I \times t$$

4.3. PROCEDIMIENTO

4.3.1. Preparación, condiciones, desarrollo y toma de muestras

Todos los ensayos de desinfección se realizan en vasos de precipitados pírrex de 50 mL, esterilizados, en constante agitación magnética, de forma que se consideran reactores en discontinuo (o “batch”) de mezcla perfecta. Los ensayos de cloración y de peroxidación se realizan en oscuridad, cubriendo los vasos de precipitados con papel de aluminio para asegurar la completa ausencia de luz. Como control, se emplean viales con el mismo volumen y misma concentración inicial de amebas, pero sin agente desinfectante. Los ensayos se realizan, al menos, por duplicado.

El inóculo inicial de amebas se obtiene a partir del cultivo líquido PPYG de cada una de las cepas de estudio. Para ello, se centrifugan 5 mL de medio a 6000xg durante 10 minutos y se lava el precipitado con suero fisiológico estéril. Este proceso se repite tres veces. Una vez obtenido el concentrado de AVL, se determina su concentración mediante hemocitómetro (Apartado III.1.4.1) y se calcula el volumen del inóculo en función de la concentración inicial deseada y el volumen de los ensayos de desinfección.

Al inicio y al final de los tratamientos se toman alícuotas de las muestras. Adicionalmente, en los tratamientos con radiación solar, también se toman a lo largo de los mismos. A partir de ellas se determina la concentración residual del desinfectante (Cl_2 o H_2O_2) por un lado, y por otro, se evalúa la supervivencia de las AVL y las BE. Para evitar su interferencia en los ensayos de inactivación, se neutraliza el efecto del desinfectante de las muestras una vez se ha evaluado la concentración residual del desinfectante. Para ello, se añade tiosulfato sódico (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a las alícuotas muestreadas, tanto las pertenecientes a los tratamientos como a los controles.

Adicionalmente, al inicio y al final de cada tratamiento, se mide el pH de las soluciones mediante un pH-metro GLP 21 Crison, Hach Lange Spain (Barcelona, España).

4.3.2. Evaluación de la inactivación de *Acanthamoeba*

La inactivación de las AVL en este estudio se define mediante el cálculo de la reducción logarítmica (Ecuación III.4), donde N_0 y N son los números más probables de amebas viables al inicio y tras un tiempo t de tratamiento, respectivamente.

Ecuación III.4.
$$\text{Inactivación microbiana} = \text{Log} \left(\frac{N_0}{N} \right)$$

4.3.3. Evaluación de la inactivación de las bacterias endocitobiontes

La inactivación de las bacterias endocitobiontes (BE) se determina mediante análisis cualitativo; para ello, una vez tomadas las muestras al inicio y al final de los tratamientos (y a lo largo de los mismos en los tratamientos con radiación solar), se inoculan cinco alícuotas de 100 μL de la muestra problema sobre una placa de medio Müller Hinton y, tras 2 días de incubación a 37 °C, se observa la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, tal y como se muestra en la Figura III.13. La inactivación de las BE se expresa mediante tres categorías cualitativas:

- **No hay inactivación:** la supervivencia de las BE no se ve afectada, es decir, el crecimiento de las BE de la muestra problema es igual que el crecimiento de las BE de las muestras control
- **Inactivación parcial:** se causa la muerte de parte de la población de las BE, se observa menor crecimiento de las BE de la muestra problema comparando con el control
- **Inactivación total de las bacterias:** se causa la muerte de la totalidad de las BE, no se observa ningún crecimiento de las BE

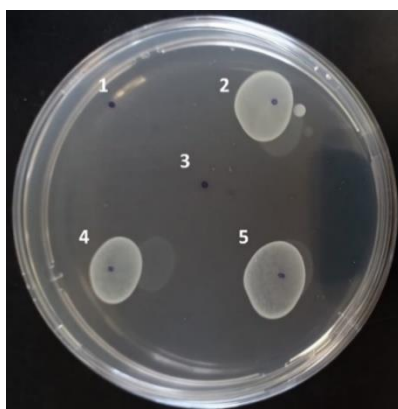


Figura III.13. Inactivación parcial de las BE: inoculaciones con crecimiento de BE (puntos 2, 4 y 5) y sin crecimiento de BE (puntos 1 y 3) en medio Müller Hinton tras 24 h de incubación a 37 °C.

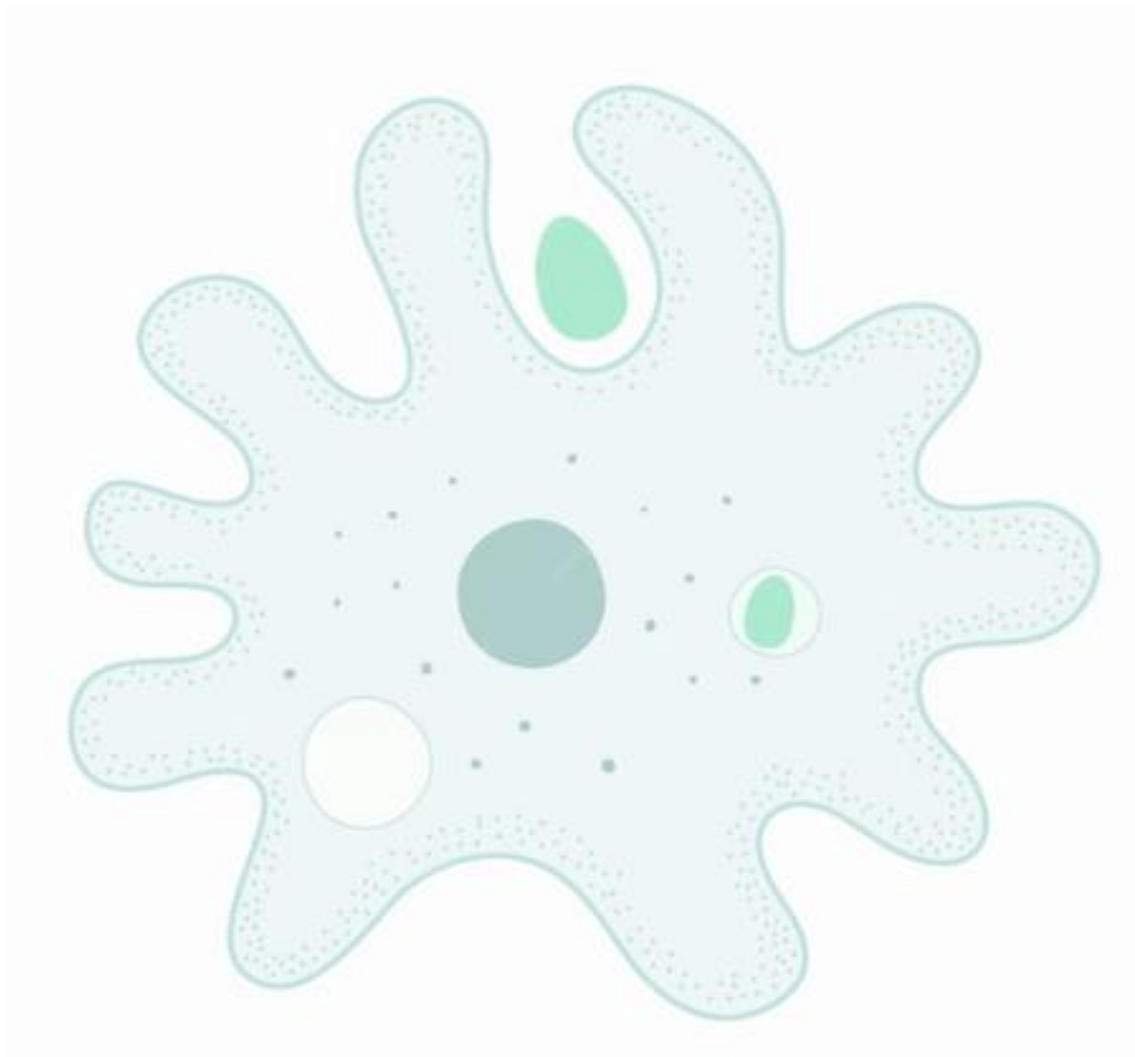
4.3.4. Evaluación de la efectividad del tratamiento de desinfección

Para evaluar la relación dosis-respuesta de un desinfectante frente a un determinado organismo, existen diferentes indicadores que permiten determinar la toxicidad del mismo y, en este caso, la efectividad del tratamiento desinfectante. En el presente estudio, a partir de la regresión de la sección lineal de las gráficas de inactivación de *Acanthamoeba*, se estiman las concentraciones de Cl_2 y H_2O_2 , el CT y la dosis de RS necesarios para alcanzar una reducción de 2 ($[\text{Cl}_2]_{99\%}$, $\text{CT}_{99\%}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_{99\%}$, $\text{D}_{99\%}$) y 3 ($[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$ y $\text{CT}_{99,9\%}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_{99,9\%}$, $\text{D}_{99,9\%}$) unidades logarítmicas.

Las gráficas de inactivación de *Acanthamoeba* y las ecuaciones de regresión se obtienen mediante el Software Microsoft Excel 365. A partir de los resultados obtenidos para las bacterias endocitobiontes, se estiman la concentración de Cl_2 ($[\text{Cl}_2]_{\text{PB}}$), H_2O_2 ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{PB}}$), el CT (CT_{PB}) y la dosis de RS (D_{PB}) necesarios para la inactivación total de las BE, entendiendo estos valores como aquellos que resultaron en la ausencia total de crecimiento bacteriano bajo las condiciones estudiadas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN RELATIVOS A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA LIBRE Y SUS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES PRESENTES EN AGUAS DE RÍO



1. AMEBAS DE VIDA LIBRE EN AGUAS DE RÍO

Con el objeto de aislar e identificar las poblaciones de amebas de vida libres (AVL) presentes en las aguas de ríos de la Cuenca del Ebro en puntos con presión ganadera, se lleva a cabo la filtración de 14 muestras de agua superficial provenientes de las 7 estaciones de muestreo (EM.1-EM.7) indicadas en la Figura III.1. Posteriormente, se realiza un análisis filogenético de las AVL que pudieron ser secuenciadas. A lo largo del presente capítulo, se hace referencia a las estaciones de muestreo como EM.1.1, EM.2.1, EM.3.1, etc., si los resultados corresponden al muestreo de la primera campaña (tomada en primavera del año 2018) o como EM.1.2, EM.2.2, EM.3.2, etc., si corresponden al muestreo de la segunda (tomada en otoño del mismo año).

1.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AMEBAS DE VIDA LIBRE

Tras el filtrado de las muestras y el proceso de aislamiento, cultivo y axenización, realizado según la metodología descrita en el Apartado III.1.3, se obtiene un total de 139 aislamientos de amebas de vida libre (AVL). Posteriormente, se extrae el ADN de estos cultivos axénicos para la identificación de las AVL mediante técnicas de biología molecular. En total, se consiguen amplificar genéticamente 90 aislamientos (65 %) mediante al menos uno de los pares de cebadores empleados para la identificación de amebas (FLA, JDP o ITS/FW), logrando identificar a nivel de género 62 de los aislamientos (45 % del total), como se muestra en la Tabla IV.1.

En estudios previos también se ha reportado un menor número de muestras secuenciadas respecto al total de aislamientos positivos para cultivo de AVL (García y col., 2013), con tasas de identificación de AVL que varían enormemente, desde el 58 % (Moreno-Mesonero y col., 2017) hasta el 99 % (Magnet y col., 2013), las cuales están relacionadas con la metodología aplicada. En este sentido, cabe destacar que, aunque la PCR es una técnica más sensible y específica para la identificación de AVL que la identificación morfológica por observación al microscopio, se ha observado que las muestras ambientales pueden contener compuestos inhibidores de PCR que dificulten el proceso de identificación (Gomes y col., 2020). Esto explica parte de los impedimentos detectados en los procesos identificación de las amebas (como controles positivos negativos y viceversa en los procesos de PCR), especialmente empleando los cebadores FLA. Cabe destacar también la desnaturalización de muestras de ADN durante los procesos de extracción y purificación, y los problemas en la secuenciación, no pudiendo obtener electroferogramas u obteniendo secuencias demasiado cortas para su identificación, como dificultades encontradas en la consecución con éxito de los procesos de identificación y secuenciación de los aislamientos.

Tabla IV.1. Número de aislamientos de AVL obtenidos a partir de las aguas superficiales analizadas en las diferentes estaciones de muestreo (EM) y resultados de la identificación mediante técnicas de biología molecular.

ESTACIÓN	Nº AISLAMIENTOS	ACANTHAMOEBA SP.	NAEGLERIA SP.	
CAMPAÑA 1	EM.1	8	6	0
	EM.2	10	6	0
	EM.3	8	3	0
	EM.4	6	2	0
	EM.5	9	3	2
	EM.6	11	10	0
	EM.7	8	0	1
CAMPAÑA 2	EM.1	8	6	0
	EM.2	20	10	2
	EM.3	17	4	0
	EM.4	7	0	0
	EM.5	11	4	0
	EM.6	8	1	0
	EM.7	8	0	2
TOTAL	139	55	7	

La secuencia de amplicones obtenidos con los cebadores FLA permiten detectar que al menos 21 cultivos (15 %) son mixtos ya que han proporcionado varias bandas. Este resultado refleja la complejidad de la técnica de aislamiento mediante cultivos en agar y observación microscópica, debido a la variabilidad en tamaño y morfología de las amebas de un mismo género (Ettinger y col., 2003; Tsvetkova y col., 2004), que incluso varían dependiendo de las condiciones del cultivo (Rayamajhee y col., 2022). Estas dificultades se han visto reflejadas en electroferogramas correspondientes a una única banda de electroforesis purificada que, al secuenciar, han resultado ser cepas mixtas u hongos (*Cladosporium* sp. concretamente) o en el aislamiento de cepas visualmente diferentes que, tras su secuenciación, han resultado ser idénticas.

En este sentido, Magnet y col. (2013) subrayan la importancia de combinar técnicas de cultivo y de biología molecular para obtener resultados más fiables de identificación. Aun así, se requiere la estandarización de técnicas de muestreo y procesamiento para la detección e identificación de AVL de muestras ambientales que además permita la identificación de una mayor variedad de géneros amebianos, ya que se ha observado que las técnicas empleadas seleccionan el crecimiento de ciertos géneros e inhibe el de otros (Goñi y col., 2014).

Géneros de amebas de vida libre identificados: *Acanthamoeba* y *Naegleria*

Mediante los cebadores específicos y la metodología de identificación de amebas (Apartado III.1.5), se determina que 55 de los aislamientos pertenecen al género *Acanthamoeba* sp. y 7 a *Naegleria* sp. (Tabla IV.1). Los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* ya han sido detectados en aguas de río, tal y como indican trabajos anteriores realizados en aguas superficiales de Aragón (García y col., 2013), otras zonas de España (Corsaro y col., 2010), Francia (Thomas y col., 2008), Bulgaria (Tsvetkova y col., 2004), Irán (Niyati y col., 2012) y Estados Unidos (Ettinger y col., 2003). Además, también se ha detectado *Acanthamoeba* como el género más abundante en el estudio realizado en aguas superficiales de Aragón (García y col., 2013), así como en estudios realizados en estaciones depuradoras de aguas residuales de Navarra (Mosteo y col., 2013) y fuentes públicas de Galicia (Paniagua-Crespo y col., 1990). Sin embargo, otros análisis llevados a cabo en España muestran tasas variadas para estos géneros (Corsaro y col., 2010; Penas-Ares y col., 1994).

Acanthamoeba spp. es la ameba de vida libre más abundante en el medio ambiente (Gomes y col., 2016a) y así lo ha sido en este estudio, habiéndose identificado como pertenecientes a este género el 89 % (55 de 62) de los aislamientos, correspondientes a 11 de las 14 aguas superficiales analizadas. Se ha detectado en agua provenientes de ríos, estaciones depuradoras y potabilizadoras, agua potable, fuentes públicas, piscinas, spas, redes de distribución hospitalarias, torres de refrigeración, drenajes de industrias farmacéuticas, entre otros (Berk y col., 2006; Corsaro y col., 2010; Fernández, 2014; García y col., 2013; Lass y col., 2017; Lorenzo-Morales y col., 2005; Mosteo y col., 2013; Muchesa y col., 2018; Nisar y col., 2022; Paniagua-Crespo y col., 1990; Penas-Ares y col., 1994).

Se trata de un género potencialmente patógeno, que ha adquirido una mayor relevancia durante estas últimas décadas debido al aumento de la incidencia de queratitis amebiana, una infección de la córnea, dolorosa y potencialmente cegadora, causada especialmente por este género de AVL. *Acanthamoeba* también puede ocasionar lesiones cutáneas, neumonía que puede conllevar a una acantamebiasis diseminada o encefalitis amebiana granulomatosa, una infección del sistema nervioso central mortal (Visvesvara y col., 2007; Rayamajhee y col., 2022). Actividades acuáticas como bañarse, ducharse o nadar en aguas contaminadas, especialmente mientras se usan lentes de contacto pone en riesgo a los usuarios (Javanmard y col., 2017) y remarca la importancia de la vigilancia microbiológica de poblaciones, especialmente en zonas dedicadas al baño recreativo.

Tradicionalmente, se han descrito diferentes especies de *Acanthamoeba* basándose en criterios morfológicos y, posteriormente, bioquímicos, inmunológicos y fisiológicos. El avance en metodologías de análisis molecular ha permitido desarrollar una clasificación en función de los genotipos de este género; concretamente, el análisis de la secuencia genética del ARN ribosómico (ARNr) 18 S es la técnica más ampliamente usada para la caracterización de aislamientos de *Acanthamoeba* (Lass y col., 2017). Hasta la fecha, se han podido identificar 23 genotipos diferentes (Putaporntip y col., 2021). En el Apartado IV.1.2 se explica el análisis filogenético de las especies de *Acanthamoeba* aisladas.

Naegleria spp. está ampliamente distribuida en aguas ambientales (Thomas y col., 2008), aunque su distribución varía según los estudios; por ejemplo, Corsaro y col. (2010) reportaron *Naegleria* como la ameba más abundante (44 % de los aislamientos) en tres estaciones potabilizadoras de agua de España mientras que, en el presente estudio, este género se ha detectado en el 11 % (7 de 62) de los aislamientos. Este valor se asemeja a la tasa detectada en reservorios de agua en Aragón, que es del 13 % (García y col., 2013). Ha de considerarse que las amebas posiblemente se concentren y aumenten su número desde que se toman las muestras hasta que se llevan a cabo los procesos de cultivo y posterior detección debido al contenido en materia orgánica (Marín y col., 2014) y que la relación de abundancia entre *Naegleria* - *Acanthamoeba* favorece a la segunda (Rodríguez-Zaragoza, 1994).

El género *Naegleria* está compuesto por 47 especies descritas hasta la fecha, las cuales se pueden identificar mediante la secuenciación de la región ITS del genoma (Javanmard y col., 2017). La única especie considerada patógena para el ser humano es *N. fowleri*, causante de una meningoencefalitis amebiana primaria que ha resultado ser mortal en el 95 % de los casos, afectando especialmente a niños sanos. Se caracteriza por crecer en aguas a altas temperaturas; de hecho, en Europa se ha detectado frecuentemente en aguas de refrigeración industriales, mientras que en otros continentes se han aislado mayoritariamente de aguas calientes naturales (De Jonckheere, 2014). Para su detección rápida, Pélandakis y Pernin (2002) desarrollaron el cebador FW, que permite amplificar genéticamente *N. fowleri* y otras especies termofílicas.

En el presente trabajo, mediante técnicas moleculares, 7 aislamientos amplifican para la presencia de *Naegleria* sp. (cebador ITS) y 3 de ellas amplifican al emplear el cebador FW. Mediante la secuenciación de los productos de PCR obtenidos a partir de las amplificaciones positivas para el cebador FW, se identifica la presencia de *N. australiensis* en las EM.7.1 y EM.7.2 y *N. lovaniensis* en la EM.7.2. Tras alinear las secuencias de *N. australiensis* mediante el Software LALIGN (<http://www.apache.org/licenses/LICENSE-2.0>), se obtiene una identidad del 100 %. Los

restantes aislamientos, pertenecientes a las EM.5.1 y EM.2.2 no pudieron ser identificados a nivel de especie.

Naegleria australiensis es una especie de *Naegleria* que suele aislarse con frecuencia y en grandes cantidades (De Jonckheere, 2014). Su presencia se ha visto relacionada en diferentes ocasiones con la contaminación térmica por industrias (Milanez y col., 2019). Hasta la fecha, se considera un patógeno potencial, ya que ha demostrado ser patógena en animales de experimentación, pero no en humanos (De Jonckheere, 2014). Esta especie se ha detectado en diferentes ambientes acuáticos, como ríos o spas y en agua empleada para potabilizar, regar cultivos, pescar y generar de energía (Edagawa y col., 2009; Javanmard y col., 2017; Lee y Park, 2023; Milanez y col., 2019; Scaglia y col., 1983). Edagawa y col. (2009) describieron el aislamiento de *N. australiensis* en condiciones de cultivo a 30 °C, coincidiendo con las condiciones del presente trabajo.

Por su parte, *N. lovaniensis* es la especie filogenéticamente más cercana a *N. fowleri*, pero no es patógena. Esta especie se ha aislado de aguas termales naturales (a 45 °C) en México (Rivera y col., 1990), Bélgica y Estados Unidos (Stevens y col., 1980), y en piscinas terapéuticas de un hospital (De Jonckheere, 1982). *Naegleria lovaniensis* tiene los mismos requerimientos de temperatura que *N. fowleri* y, por tanto, suelen encontrarse a menudo juntas en aislamientos del medio ambiente (De Jonckheere, 2014); por tanto, aunque no se ha detectado *N. fowleri* en las aguas superficiales evaluadas, no puede descartarse su presencia ya que las técnicas de cultivo empleadas no permiten su crecimiento *in vitro*.

Acanthamoeba spp. y *Naegleria* spp. son dos de los géneros más asociados con enfermedades humanas (García y col., 2011). Aunque se han encontrado otros géneros de amebas en ríos que también son potencialmente patógenas, ha de tenerse en cuenta que el cultivo es una técnica limitante que subestima la diversidad y densidad de las AVL (Goñi y col., 2014) y que subcultivar favorece la pérdida de cepas aisladas (Rodríguez-Zaragoza, 1994). En este sentido, hay algunas especies de especial interés clínico, como *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea*, *Paravahlkampfia francinae* o la ya mencionada, *N. fowleri*, que no son capaces de crecer en las condiciones de cultivo establecidas y, por ello, no puede garantizarse su ausencia (García y col., 2011).

1.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Con el objeto de vigilar y caracterizar las AVL presentes en las aguas de ríos de la Cuenca del Ebro con presión ganadera y estudiar las relaciones entre las amebas aisladas en dichos ríos, se realiza un análisis filogenético de las AVL. Este análisis se basa en las relaciones existentes entre los fragmentos de ADN que pudieron ser secuenciados y, comprende, por un lado, la comparación entre las secuencias de *Acanthamoeba* obtenidas entre sí, para determinar las relaciones entre las cepas y, por otro, la comparación de estas con secuencias de referencia para conocer el genotipo de las cepas identificadas. Este procedimiento se lleva a cabo mediante la metodología descrita en el Apartado II.1.5.4.

En total, los resultados del Apartado IV.1.1. permiten obtener un total de 28 secuencias de nucleótidos de *Acanthamoeba*, siendo tres de ellas demasiado cortas y, por tanto, se realiza el estudio filogenético sobre 25 secuencias de *Acanthamoeba*. Tras realizar el alineamiento de las secuencias, se selecciona un fragmento común a todas las secuencias, de 328 pares de bases, y utilizando el método *Neighbor-Joining* (NJ), se obtiene el árbol filogenético considerado más óptimo, el cual se muestra en la Figura IV.1. Los valores de los nodos indican el porcentaje de pseudoréplicas (de las 1000 realizadas por el programa informático) en las que se asocian los diferentes taxones de la misma manera (Felsenstein, 1985). La matriz de identidades, calculada a partir de las 25 secuencias analizadas, indica que la identidad varía entre 0,978 y 1, señalando que estas poblaciones de AVL tienen una relación evolutiva cercana.

Según el árbol filogenético, se observan dos grandes grupos filogenéticos de las *Acanthamoeba* estudiadas. Uno de ellos está compuesto por 22 secuencias, provenientes de las amebas aisladas de las EM.1.1 (C1-1111, C1-1113, C1-112, C1-12, C1-141, C1-142), EM.2.1 (C1-211, C1-2132, C1-231), EM.5.1 (C1-521, C1-522), EM.6.1 (C1-614, C1-62112, C1-623, C1-643), EM.2.2 (C2-221a, C2-221b, C2-223, C2-2311, C2-23161, C2-252) y EM.3.2 (C2-331), de las cuales, 14 son idénticas. El segundo grupo está compuesto por 3 secuencias pertenecientes a las amebas aisladas de EM.2.1 (C1-221, C1-2221) y EM.6.1 (C1-631), siendo las secuencias C1-2221 y C1-631 idénticas.

Para determinar el genotipo de las secuencias de *Acanthamoeba* identificadas, estas se comparan con secuencias de referencia pertenecientes a los 23 genotipos identificados hasta la fecha (Putaporntip y col., 2021), tomando las secuencias de la base de datos GeneBank. En la Figura IV.2 se muestra el árbol filogenético obtenido mediante el método NJ. Las secuencias de referencia pertenecientes a los genotipos T7, T8, T9, T17 y T18 mostraron grandes diferencias a las secuencias de estudio y, debido a que provocaban grandes modificaciones en el alineamiento de secuencias, no se muestran en el árbol.

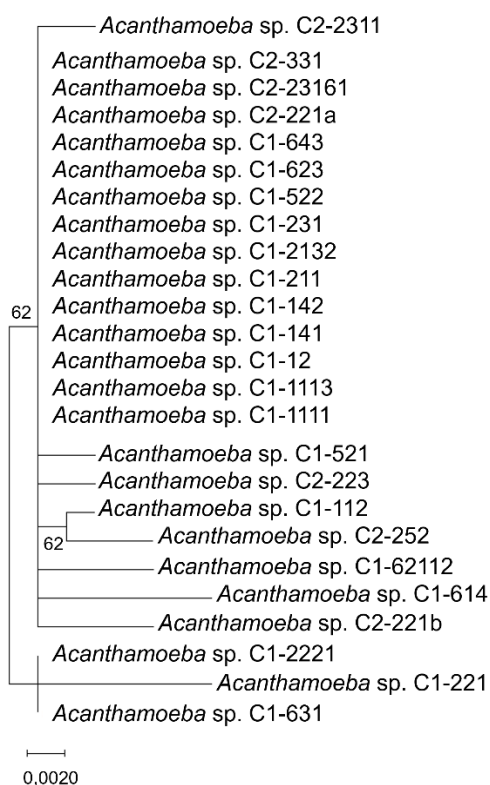


Figura IV.1. Filogenia de las secuencias de *Acanthamoeba* identificadas mediante *Neighbor-Joining* (1000 broosts). Análisis realizado mediante el Software MEGA v.11.

Se puede observar que todas las secuencias de *Acanthamoeba* estudiadas pertenecen al genotipo T4, presentando todas ellas más del 99 % de identidad con las secuencias pertenecientes a este genotipo, según se obtiene en la matriz de identidades. Se trata del genotipo más abundante en el medio ambiente y, también, el más frecuentemente identificado como causante de enfermedades, especialmente en casos de queratitis amebiana (Lass y col., 2017). En la Tabla IV.2 se muestra la identificación de las AVL, el genotipado y los códigos de registro en la base de datos GeneBank clasificados según las estaciones y campañas de muestreo del estudio.

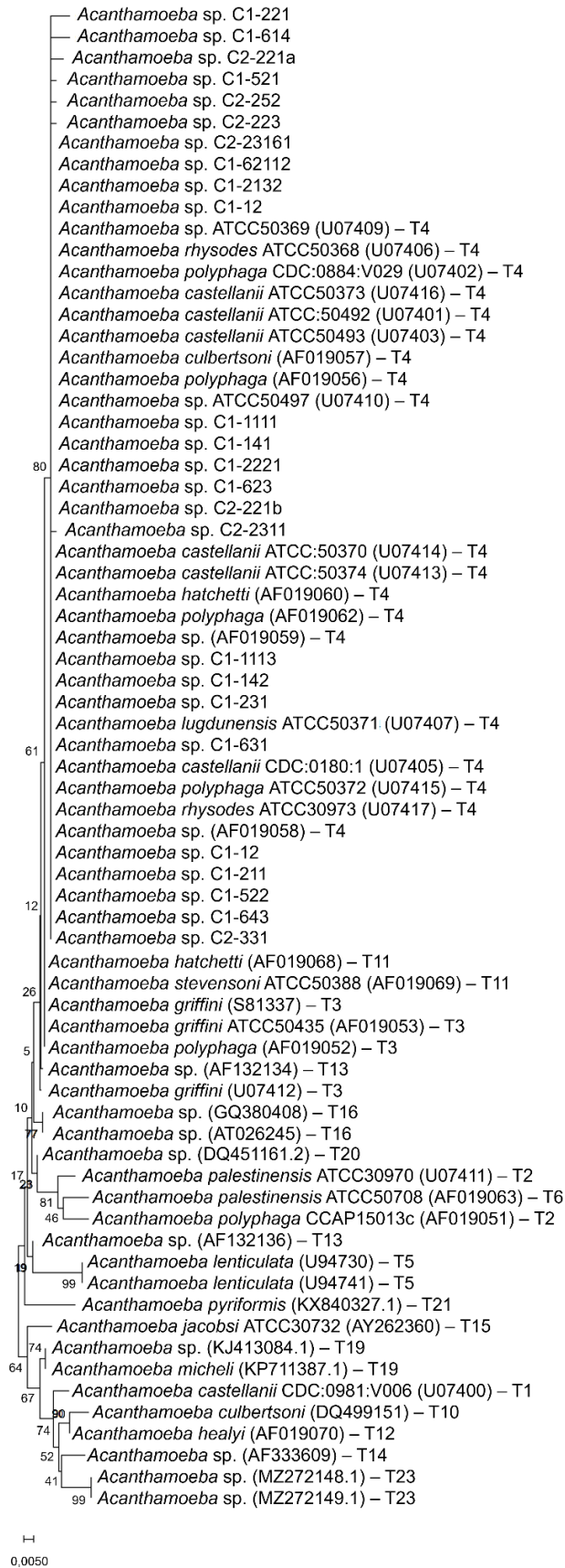


Figura IV.2. Árbol filogenético para la determinación del genotipo de las secuencias de *Acanthamoeba* identificadas al compararlas con secuencias de referencia mediante NJ (1000 réplicas). Análisis realizado mediante el Software MEGA v.11.

Tabla IV.2. Resultados de la identificación y genotipado de los aislamientos de AVL mediante técnicas de biología molecular y código del registro de las secuencias en la Base de Datos GeneBank.

ESTACIÓN	AISLAMIENTO	IDENTIFICACIÓN	REFERENCIA GENE BANK
EM.1.1	1111	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031345
	1113	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031346
	112	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031347
	12	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031348
	141	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031349
	142	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031350
EM.2.1	211	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	OQ927217
	2132	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031351
	221	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031352
	2221	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031353
	2222	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	223	<i>Acanthamoeba</i> sp.	PQ031354
	231	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031355
EM.3.1	3112	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	3121	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	313	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
EM.4.1	431	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	443	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
EM.5.1	521	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031356
	522	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031357
	541	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	5512	<i>Naegleria</i> sp.	ns
	5521	<i>Naegleria</i> sp.	ns
EM.6.1	611	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	614	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031358
	62112	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031359
	6212	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	622	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	623	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031360
	631	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031361
	632	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	642	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	643	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031362
EM.7.1	71	<i>N. australiensis</i>	PQ031370
EM.1.2	11	<i>Acanthamoeba</i> sp.	c
	12	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	14	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	151	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	152	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	16	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns

c: secuencia demasiado corta; EM: estación de muestreo; ns: aislamiento no secuenciado.

Tabla IV.2. Resultados de la identificación y genotipado de los aislamientos de AVL mediante técnicas de biología molecular y código del registro de las secuencias en la Base de Datos GeneBank. *Continuación.*

ESTACIÓN	AISLAMIENTO	IDENTIFICACIÓN	REFERENCIA GENE BANK
EM.2.2	221	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031363
		<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031364
	222	<i>Acanthamoeba</i> sp.	c
	223	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031365
	2311	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031366
	23122	<i>Naegleria</i> sp.	ns
	23123	<i>Naegleria</i> sp.	ns
	23124	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	2314	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	23161	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031367
	23162	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	232	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	252	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031368
EM.3.2	31	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	32	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	331	<i>Acanthamoeba</i> sp. T4	PQ031369
	332	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
EM.5.2	51	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	521	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	522	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
	53	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
EM.6.2	6212	<i>Acanthamoeba</i> sp.	ns
EM.7.2	722	<i>N. lovaniensis</i>	PQ031371
	789	<i>N. australiensis</i>	PQ031372

c: secuencia demasiado corta; EM: estación de muestreo; ns: aislamiento no secuenciado.

2. EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

Con el objeto de aislar e identificar las bacterias endocitobiontes (BE) del interior de las amebas de vida libre presentes en las aguas de ríos de la Cuenca del Ebro con presión ganadera, se lleva a cabo la extracción de BE de una selección de cultivos de AVL capaces de crecer en medio axénico. Posteriormente, se seleccionan las BE de mayor interés en función de la sensibilidad a antibióticos detectada (resultados discutidos en el Capítulo IV) y se identifican mediante caracterización proteómica.

2.1. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

La extracción y aislamiento de las bacterias endocitobiontes (BE) situadas en el interior de las amebas de vida libre (AVL) se realiza para una selección de 64 AVL de aguas superficiales que presentan la concentración de AVL necesaria, aplicando la metodología descrita en el Apartado III.2; estas AVL proceden de las EM.1.1-EM.7.1, EM.1.2 y EM.2.2. Se observa crecimiento de BE a partir de la lisis de 43 de las AVL seleccionadas, es decir en el 65 % de los cultivos de AVL evaluados. En total, a partir de las 64 AVL seleccionadas, se aíslan 379 cepas de BE, tal y como muestra la Tabla IV.3. Algunas de las BE extraídas crecieron en medio selectivo con apramicina, gentamicina o ampicilina, demostrando su resistencia a la presencia de estos antibióticos; estos resultados se evalúan en profundidad en el Capítulo IV. En la Figura IV.3 se muestra un ejemplo de BE crecidas a partir del proceso de lisis y extracción.

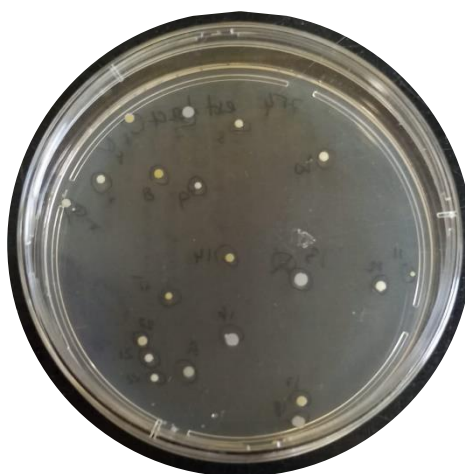


Figura IV.3. Bacterias endocitobiontes crecidas en MH tras 24 horas de incubación, procedentes de la lisis de la AVL 75 de la EM.7.1.

Los resultados muestran una tasa de AVL con bacterias en su interior inferior al estudio realizado por García y col. (2013) en reservas de agua y algunas plantas de tratamiento de Aragón, en el que detectaron bacterias en el interior del 88 % de las AVL aisladas; si bien, cabe destacar que emplearon técnicas moleculares y no de cultivo para su detección. Por otro lado, los resultados obtenidos son muy superiores a los obtenidos por Thomas y col. (2008) y Corsaro y col. (2010) en una y tres estaciones potabilizadoras de Francia y España, respectivamente: Thomas y col. sólo detectaron bacterias en el interior de 4 de las 50 amebas aisladas (2 %) mediante técnicas de co-cultivo y Corsaro y col. (2010) detectaron un 16 % de AVL portadoras de BE mediante PCR.

Tabla IV.3. Número de amebas de vida libre (AVL) sometidas al proceso de lisis y positivas para el crecimiento de bacterias endocitobiontes (BE). Número de BE extraídas y medios de cultivo que permitieron su selección.

ESTACIÓN	Nº AVL LISADAS	Nº AVL BE+	Nº BE AISLADAS	MEDIO DE AISLAMIENTO			
				MH	APR	GM	AMP
EM.1.1	8	6	77	70*	1	1	5
EM.2.1	6	4	34	23*	6	3†	2†
EM.3.1	8	2	10	8*	0	1	1
EM.4.1	6	1	5	4	1	0	0
EM.5.1	6	6	114	108	4	0	2
EM.6.1	10	5	19	17	0	0	2
EM.7.1	6	5	36	35*	1	0	1
EM.1.2	5	5	27	27*	0	0	0
EM.2.2	9	9	57	57	0	0	0
TOTAL	64	43	379	348	13	5	13

* Alguno de los lisados presentaba incontables bacterias extraídas; † se aislan levaduras; AMP: ampicilina; APR: apramicina; EM: estación de muestreo; GM: gentamicina; MH: Müller Hinton sin antibióticos.

2.2. IDENTIFICACIÓN

La identificación de las cepas de BE se lleva a cabo mediante técnicas de identificación proteómica (como se indica en el Apartado III.2.4). En total, se seleccionan las 83 cepas de mayor interés según su sensibilidad a antibióticos (información mostrada en el Capítulo IV), todas pertenecientes a la primera campaña de muestreo, resultando dos de ellas ser levaduras (concretamente, *Candida* sp.) y no pudiéndose identificar otras cuatro cepas al no crecer tras su resiembra. Las cepas identificadas se conservan en leche a -20 °C. Los resultados de la identificación de las BE se muestran en las Tablas IV.4 y IV.5.

Las 77 bacterias identificadas corresponden a un total de 19 especies bacterianas, pertenecientes a 9 géneros diferentes. La mayoría de los aislamientos pertenecen, en orden de prevalencia, a los géneros *Staphylococcus* (44 %), seguido de *Bacillus* (26 %) y *Microbacterium* (16 %). En total, las BE identificadas pertenecen a 3 filos: 56 aislamientos (73 %) corresponden a *Firmicutes* (*Staphylococcus*, *Bacillus* y *Paenibacillus*), 18 (23 %) a *Actinomycetota*, pertenecientes todas a la familia *Micrococcaceae* (*Microbacterium*, *Micrococcus* y *Kocuria*), y 3 (4 %) a *Proteobacterias*, pertenecientes todas a las gammaproteobacterias, pero a tres familias distintas (*Erwiniaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*).

Staphylococcus

En el presente trabajo, se han extraído 34 cepas de *Staphylococcus* sp. procedentes de 11 AVL aisladas de las 7 estaciones de muestreo evaluadas. Las especies identificadas son, en orden de prevalencia, *S. warneri* (12 aislamientos), *S. pasteurii* (12), *S. epidermidis* (7) y *S. equorum* (3). *Staphylococcus* es un género de bacterias gram positivas, metabólicamente flexibles y robustos frente a estreses ambientales, lo que les permite sobrevivir y habitar una alta diversidad de nichos distintos. Se clasifican en especies coagulasa-positivas (“COPS” por sus siglas en inglés, “coagulase positive *Staphylococcus*”) y coagulasa-negativas (“CONS” por sus siglas en inglés, “coagulase negative *Staphylococcus*”). Las especies de *Staphylococcus* aisladas en el presente trabajo pertenecen al grupo de CONS, un grupo heterogéneo de *Staphylococcus* que no se basa en relaciones filogenéticas, sino que se definieron para diferenciarlo de *S. aureus*, la única especie patógena y COPS conocida en el momento de su clasificación (Fernández-Fernández y col., 2023).

Los CONS suelen encontrarse como comensales en la piel y mucosas de humanos y animales (esencialmente *S. epidermidis* y *S. warneri*). Son oportunistas y representan uno de los

principales patógenos nosocomiales, especialmente relacionados con implantes, siendo *S. epidermidis* la especie de CONS más común en infecciones (Becker y col., 2014; Fernández-Fernández y col., 2023), aunque *S. warneri* y *S. pasteurii* también se han encontrado involucrados en infecciones a personas inmunodeprimidas, bacteremias, endocarditis y colitis (Lozano-León y col., 2008; Stöhlberger y col., 2006; Yoon y Runnegar, 2019).

Bacillus

En el presente trabajo se han extraído 20 cepas de *Bacillus* sp., procedentes de 7 AVL aisladas de 3 estaciones de muestreo diferentes. Las especies identificadas son, en orden de prevalencia, *B. clausii* (9 aislamientos), *B. licheniformis* (6), *B. pumilus* (2), *B. altitudinis*, *B. cereus* y *B. niabensis* (1). El género *Bacillus* está conformado por bacterias alargadas, gram positivas, aeróbicas y anaeróbicas facultativas que presentan una gran resistencia y capacidad de formar endosporas en respuesta a estrés nutricional o ambiental. Esto les permite ser ubicuas en diversos ambientes y sobrevivir en extremos (Alcaraz y col., 2010; Jagadeesan y col., 2024). Este género de bacterias se conoce por su amplia gama de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran péptidos antimicrobianos, antibióticos, fitohormonas, enzimas líticas y proteasas, entre otros. Precisamente por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas, el género *Bacillus* está bien explorado y documentado; varias de las especies aisladas en el presente trabajo, se han empleado en biodegradación y biorremediación (*B. niabensis* y *B. altitudinis*), como biofertilizantes y biopesticidas (*B. altitudinis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*) o como productores de proteasa (*B. cereus*) a nivel industrial (Al-Hagar y col., 2021; Comba-González y col., 2024; Jagadeesan y col., 2024; Jeong y col., 2017; Su y col., 2023).

Hasta la fecha, sólo *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* se consideran patógenas, pero el número de casos parece ir en aumento. La primera de ellas se relaciona con brotes alimenticios de gastroenteritis, aunque también se ha asociado con infecciones nosocomiales⁴ y casos de bacteremia⁵ (Furuta y col., 2022; Tuipulotu y col., 2021). *Bacillus licheniformis* se considera un patógeno potencial en personas inmunodeprimidas, habiéndose reportado casos de bacteremia nosocomiales asociados a catéteres (Blue y col., 1995) y, recientemente, con su previa administración oral como probiótico (Zou y col., 2024). Por su parte, *B. pumilus* se ha relacionado con casos de septicemia⁶, infecciones cutáneas y gastrointestinales (Kimouli y col., 2012).

⁴ Infección nosocomial: infección adquirida durante la estancia en un hospital.

⁵ Bacteremia: presencia de bacterias en el torrente sanguíneo.

⁶ Septicemia (o sepsis): respuesta inflamatoria sistémica grave, que puede llevar al fallo de órganos.

Paenibacillus

En el presente trabajo, se han extraído 2 cepas de *Paenibacillus* sp. a partir de 2 AVL aisladas de 2 estaciones de muestreo diferentes. El género *Paenibacillus*, inicialmente considerado parte del género *Bacillus*, está conformado por bacilos gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos, formadores de esporas (Sharma y col., 2015). Se han aislado de una gran variedad de ambientes, como suelo, agua dulce y salada, aguas residuales, sistemas de distribución, sedimentos, plantas o alimentos (Oyewale y col., 2024; Sanz-Nieto y col., 2017). Similar al género *Bacillus*, este género bacteriano se ha empleado en agricultura por su capacidad de promover el crecimiento vegetal, en biorremediación por su capacidad de degradar sustancias tóxicas y en la industria biotecnológica por su habilidad de producir enzimas e incluso péptidos antimicrobianos de interés (Grady y col., 2016). Las especies identificadas en el presente trabajo son *P. lautus* y *P. glucanolyticus*, ambas de interés biotecnológico (Mathews y col., 2016; Yadav y col., 2021). Estas especies se han aislado en muestras clínicas (Sanz-Nieto y col., 2017) y, aunque suelen considerarse como contaminaciones, se ha relacionado a *P. lautus* con casos de bacteremia (Sharma y col., 2015) y a *P. glucanolyticus* con endocarditis y queratitis (Ferrand y col., 2013; Hassan y col., 2021).

Microbacterium

En el presente trabajo, se han extraído 12 cepas de *Microbacterium* spp. procedentes de 6 AVL aisladas de 4 estaciones de muestreo diferentes. Se identificaron 6 aislamientos como *M. paraoxydans*, 1 aislamiento como *M. arborescens* y 5 aislamientos exhibieron igual similitud para las especies *Microbacterium imperiale* y *Microbacterium arborescens*. Dos de estos aislamientos se enviaron al servicio de secuenciación del Hospital Clinic de Barcelona y, mediante identificación genética del gen ARN ribosómico (ARNr) 16 S, persistió la incertidumbre al obtener un 99,7 % de identidad con ambas especies. Este hecho puede explicarse ya que ambas especies presentan un 99,73 % de homología de la secuencia genética del gen ARNr 16 S (Gneiding y col., 2008).

El género *Microbacterium* comprende bacterias corineformes gram positivas con pigmentación amarilla. Se han aislado a partir de diferentes fuentes ambientales como suelo, aguas residuales, agua potable, humidificadores y aire de hospitales (Chorost y col., 2018; Siedlecka y col., 2021) y, además, precisamente las cepas identificadas en el presente estudio (*M. paraoxydans*, *M. arborescens* y *M. imperiale*) se han detectado también en muestras clínicas (Funke y col., 1995). Sin embargo, *M. paraoxydans* es la única de las especies aisladas de relevancia clínica hasta la

fecha. Las infecciones ocasionadas por esta bacteria son poco frecuentes, aunque el número de aislamientos nosocomiales está aumentando (Laffineur y col., 2003). Normalmente los casos están asociados con pacientes inmunodeprimidos o catéteres permanentes (Chorost y col., 2018).

Micrococcus

En el presente trabajo, se han extraído 4 cepas de *Micrococcus* spp. a partir de 3 AVL aisladas de 3 estaciones de muestreo diferentes. Los 4 aislamientos se identificaron como *M. luteus*. Se trata de una bacteria gram positiva, cocoide organizada en tétradas y aerobia estricta. Es común en la piel de mamíferos y membranas mucosas, pero también se ha aislado en suelo, sedimentos marinos, alimentos y agua dulce. Raramente causa infecciones, aunque se han documentado casos de neumonía, abscesos cerebrales y artritis séptica especialmente en personas inmunodeprimidas y, en algunos casos, relacionados con la capacidad de *M. luteus* de desarrollar un estado de letargo, denominado estado viable pero no cultivable o VBNC por sus siglas en inglés, “viable but not culturable” (El-Rhman y col., 2009; Lanniello y col., 2019; Pekala y col., 2018; Rodríguez-Nava y col., 2020).

Kocuria

En el presente trabajo, se han extraído 2 cepas de *Kocuria* spp. procedentes de 2 AVL aisladas de 2 estaciones de muestreo diferentes. Ambos aislamientos se identificaron como *K. rhizophila*. El género *Kocuria*, inicialmente clasificado como parte del género *Micrococcus*, se caracteriza por estar formado por especies aeróbicas, coccoides, gram positivas. Este género de bacterias, ubicuas en el ambiente, forman parte de la flora cutánea y oral humana. Tradicionalmente se consideraban bacterias inocuas y comensales o contaminantes de aislamientos clínicos, pero en los últimos años ha habido un aumento de casos infecciosos asociados a este género, relacionados con catéteres o pacientes inmunodeprimidos y que han llegado a causar graves afecciones. Actualmente, se consideran patógenos oportunistas y, entre ellas, *K. rhizophila* se ha reportado como causante de bacteremias y endocarditis (Pierron y col., 2021; Zhang y col., 2023b). Esta bacteria aislada por primera vez a partir de rizoplaneo⁷ (Kovacs y col., 1999), está ampliamente distribuida en el medio ambiente y, entre otros, se ha aislado de spas (Drbohlavova y col., 2019).

⁷ Rizoplaneo: zona comprendida por la superficie de las raíces.

Pantoea

En el presente trabajo, se ha extraído 1 cepa de *Pantoea* spp., que se ha identificado como *P. agglomerans*. El género *Pantoea*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está compuesto por un grupo diverso de bacterias gram negativas bacilares. En la naturaleza, suele encontrarse en asociación con plantas, tanto como patógenas como bacterias beneficiosas. También se han aislado de suelo, ambientes acuáticos (como en acuíferos, ríos, aguas termales o agua potable) y en asociación con animales y humanos. *Pantoea agglomerans* es capaz de sintetizar y secretar una gran variedad de compuestos, como compuestos orgánicos volátiles, antibióticos y biosurfactantes, que le permiten competir y sobrevivir en diferentes ambientes; lo que la ha convertido en una especie atractiva para su uso como biocontrol, biopesticida y en biorremediación (Duchateau y col., 2024; Satıcıoglu y col., 2018; Walterson y Stavrínides, 2015) e, incluso, como suplemento para prevenir la mastitis en cabras (Suzuki y col., 2023) y para acuicultura (Amenyogbe y col., 2022).

Pantoea agglomerans es la especie de su género con más casos clínicos significativos. Esta bacteria representa una importante causa de infecciones nosocomiales en individuos inmunodeprimidos, pudiendo causar serias infecciones oportunistas, tanto locales como sistémicas, como neumonía neonatal, peritonitis, bacteriemia, neumonía, sepsis, abscesos hepáticos o infecciones del tracto urinario (Satıcıoglu y col., 2018; Walterson y Stavrínides, 2015).

Pseudomonas

En el presente trabajo, se ha extraído 1 cepa de *Pseudomonas* spp., que se ha identificado como *P. koreensis*. El género *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más diversos y ecológicamente significativos. Estas bacterias se caracterizan por ser gram negativas, con forma de bastón, no formadoras de esporas y móviles gracias a uno o más flagelos. Tienen carácter protótrofo⁸ y versatilidad metabólica, plasticidad del genoma y capacidad de afrontar diferentes formas de estrés (físico, químico y antibacteriano), lo cual les permiten adaptarse y estar presentes en la mayoría de ambientes naturales terrestres y acuáticos. *Pseudomonas koreensis* se aisló por primera vez a partir de suelo agrícola en Corea, donde se ha observado que cumple funciones relacionadas con la descomposición de materia orgánica y la promoción de crecimiento de las plantas (Kwon y col., 2003; Vaz-Moreira y col., 2012). Desde entonces, se ha

⁸ Protótrofo: que puede crecer en medios de cultivo mínimos.

detectado en rizosferas, productos lácteos (Yuan y col., 2017), en agua de un lago en Méjico (Toribio y col., 2011), agua potable (Fluit y col., 2020), el efluente de una estación depuradora de aguas residuales (Camiade y col., 2020) y en agua de hospital (Biswal y col., 2023).

Recientemente se ha descrito la capacidad de *P. koreensis* de infectar a seres humanos, lo que ha llevado a considerarle un patógeno oportunista; se ha aislado de un paciente con enfermedad pulmonar (Fluit y col., 2020) y de una infección mixta de queratitis junto con el hongo *Aspergillus fumigatus* (Khoo y col., 2020).

Pseudoxanthomonas

En el presente trabajo, se ha extraído 1 cepa de *Pseudoxanthomonas* spp., que se ha identificado como *P. indica*. El género *Pseudoxanthomonas* está formado por un grupo de bacterias gram negativas, aerobias, no formadoras de esporas, aisladas a partir de hábitats ambientales como aguas termales, compost y especialmente suelo agrícola. Varias especies se han aislado de zonas contaminadas por metales pesados, petróleo o hidrocarburos, demostrando la capacidad de vivir en condiciones ambientales extremas y sus potenciales usos biotecnológicos (Bansal y col., 2022; Kumari y col., 2011; Selvaraj y col., 2022). De hecho, *P. indica* se aisló por primera vez a partir de suelo contaminado con hexaclorociclohexano en la India. También se ha aislado en la rizosfera y, tras comprobar su alta efectividad en el control de nematodos y hongos, se ha comercializado como biopesticida y biofertilizante (Lugo y col., 2019). Estudios recientes mediante secuenciación masiva han demostrado que este género es abundante en el biofilm de grifos (Liu y col., 2012) y en ambientes contaminados con antibióticos (Abdellah y col., 2023; Song y col., 2023; Zhao y col., 2022). Hasta la fecha *P. indica* no se ha asociado con ninguna infección en humanos, pero sí se ha asociado a *P. kaohsiungensis* de forma ocasional, especie de este género aislada por primera vez en una zona contaminada con petróleo que se ha relacionado con un caso de pericarditis en una persona inmunodeprimida (Kuo y Lee, 2018).

Tabla IV.4. Número de especies bacterianas obtenidas a partir del lisado de las amebas de vida libre (AVL) clasificadas según su taxonomía, patogenicidad y caracterización hasta la fecha como bacterias endocitobiontes (BE).

BACTERIA	Nº BE (AVL DE PROCEDENCIA)	Nº EM DE PROCEDENCIA	PATÓGENA	RECONOCIDA COMO BE	REFERENCIAS
Firmicutes	56 (16)	7			
<i>Bacillus</i> spp.	20 (7)	3			
<i>B. altitudinis</i>	1 (1)	1	No	No	Evstigneeva y col. (2009); Pagnier y col. (2008); Thomas y col. (2008)
<i>B. cereus</i>	1 (1)	1	Sí	Sí	
<i>B. clausii</i>	9 (1)	1	No	No	
<i>B. licheniformis</i>	6 (3)	2	Sí	Sí	Thomas y col. (2008)
<i>B. niabensis</i>	1 (1)	1	No	No	Thomas y col. (2008)
<i>B. pumilus</i>	2 (2)	1	Sí	Sí	
<i>Paenibacillus</i> spp.	2 (2)	2		Sí **	Conco-Biyela y col. (2024)
<i>P. glucanolyticus</i>	1 (1)	1	Sí	No	
<i>P. lautus</i>	1 (1)	1	Sí	No	
<i>Staphylococcus</i> spp.	34 (11)	7			
<i>S. epidermidis</i>	7 (5)	4	Sí	Sí	Cardas y col. (2012)
<i>S. equorum</i>	3 (2)	2	No	No	Evstigneeva y col. (2009)
<i>S. pasteurii</i>	11 (6)	6	Sí	Sí	
<i>S. warneri</i>	13 (3)	3	Sí	No	
Actinomycetota	18 (10)	5			
<i>Microbacterium</i> spp.	12 (6)	4		Otras especies	Evstigneeva y col. (2009); Pagnier y col. (2008); Thomas y col. (2008)
<i>M. arborescens</i> *	6 (2)	2	No	No	-
<i>M. paraoxydans</i>	6 (4)	2	Sí	Sí	Delumeau y col. (2023); Van der Loo y col. (2021)

EM: estación de muestreo; *Cinco de las cepas se consideran "*M. arborescens/imperiale*"; **Delafont y col. (2013, 2016) y Conco-Biyela y col. (2024) evaluaron el microbioma de AVL mediante secuenciación masiva y detectaron la presencia de ADN de *Pseudoxanthomonas* spp. y *Paenibacillus* spp., respectivamente, pero ningún estudio hasta la fecha ha aislado estas bacterias a partir de AVL.

Tabla IV.4. Número de especies bacterianas obtenidas a partir del lisado de las amebas de vida libre (AVL) clasificadas según su taxonomía, patogenicidad y caracterización hasta la fecha como bacterias endocitobiontes (BE). *Continuación.*

BACTERIA	Nº BE (AVL DE PROCEDENCIA)	Nº EM DE PROCEDENCIA	PATÓGENA	RECONOCIDA COMO BE	REFERENCIAS
<i>Micrococcus</i> spp.	4 (3)	3			
<i>M. luteus</i>	4 (3)	3	Sí	No	
<i>Kocuria</i> spp.	2 (2)	2		Otras especies	Thomas y col. (2008)
<i>K. rhizophila</i>	2 (2)	2	Sí	No	
<i>Proteobacterias</i>	3 (2)	1			
<i>Enterobacteriales</i>	1 (1)	1			
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (1)	1	Sí	Sí	Pagnier y col. (2008)
<i>Pseudomoniales</i>	1 (1)	1			
<i>Pseudomonas koreensis</i>	1 (1)	1	Sí	Sí	Van der Loo y col. (2021)
<i>Pseudoxanthomonas</i>	1 (1)	1	Otras especies	Sí **	Delafont y col. (2013, 2016)
<i>Pseudoxanthomonas indica</i>	1 (1)	1	No	No	

EM: estación de muestreo; *Cinco de las cepas se consideran "*M. arborescens/imperiale*"; **Delafont y col. (2013, 2016) y Conco-Biyela y col. (2024) evaluaron el microbioma de AVL mediante secuenciación masiva y detectaron la presencia de ADN de *Pseudoxanthomonas* spp. y *Paenibacillus* spp., respectivamente, pero ningún estudio hasta la fecha ha aislado estas bacterias a partir de AVL.

2.3. ESTUDIOS PREVIOS Y DEFINICIÓN DE NUEVAS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

En la Tabla IV.5 se presentan de manera detallada las especies bacterianas identificadas y las AVL de las que fueron extraídas y aisladas (pertenecientes todas a la primera campaña, como se indica en el Apartado 2.2 del presente capítulo). Cada BE tiene un código que indica la AVL de la que procede. El primer dígito de este código, a su vez, señala la estación de muestreo de origen. Por ejemplo, la cepa *Microbacterium paraoxydans* 1111.34 se ha extraído de la AVL 1111, aislada de la EM.1 (río Segre en Torres de Segre).

Varias de las especies bacterianas identificadas en el presente estudio ya han sido descritas como bacterias endocitobiontes hasta la fecha (Tabla IV.4): *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. pasteurii*, *Microbacterium paraoxydans*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas koreensis*. También se han descrito algunas especies pertenecientes a los géneros *Micrococcus* spp. y *Kocuria* spp. como BE. Por ejemplo, Pagnier y col. (2008), mediante co-cultivo con *Acanthamoeba polyphaga*, aislaron *B. cereus*, *P. agglomerans* y varias *Pseudomonas* spp. y *Microbacterium* spp. a partir de agua de río, fuentes, lagos y pozos domésticos de Francia. Thomas y col. (2008), a partir de 4 amebas de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) de Francia, aislaron 65 bacterias pertenecientes a 23 géneros diferentes y, entre ellas, varios *Bacillus* spp., como *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. cereus*, *Kocuria* spp., *Microbacterium* spp. y *Pseudomonas* spp. Van der Loo y col. (2021) detectaron, entre otras, a *M. paraoxydans* y *P. koreensis* en el interior de AVL aisladas de agua de pozo.

En estudios de secuenciación masiva, Moreno-Mesonero y col. (2020a) observaron que la clase más abundante de BE en AVL aisladas de una EDAR en Valencia eran las gammaproteobacterias (22 %), bacterias gram negativas, pero el género más abundante era *Bacillus* (9 %), uno de los géneros más abundantes identificados en las aguas superficiales del presente estudio. Delafont y col. (2013) estimaron que la biodiversidad bacteriana de las AVL presentes en agua potable de París se encontraba entre 180 y 400 géneros, además detectaron que *Bacillus* spp. y *Pseudoxanthomonas* spp. eran géneros bacterianos especialmente representativos en dos estaciones de muestreo diferentes. Delafont y col. (2016) obtuvieron 155 taxones diferentes en agua de red potable y, entre ellos, predominaba *Pseudomonas* spp; asimismo, detectaron los géneros *Pseudoxanthomonas* spp., *Microbacterium* spp. y *Bacillus* spp. Moreno-Mesonero y col. (2020b) también registraron *Pseudoxanthomonas* spp. como uno de los géneros más predominantes en AVL en un estudio realizado en lechugas en España. Por otro lado, Conco-Biyela y col. (2024) detectaron *Paenibacillus* spp. como uno de los filos bacterianos más

abundantes en aislamientos de *Acanthamoeba* obtenidos a partir de efluentes clorados de EDAR.

De esta manera y, hasta donde se sabe, esta es la primera vez que se describe a *Staphylococcus equorum*, *S. warneri*, *Bacillus altitudinis*, *B. clausii*, *B. niabensis*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *P. lautus*, *Microbacterium arborescens/imperiale*, *Micrococcus luteus*, *Kokuria rhizophila* y *Pseudoxanthomonas indica* como bacterias capaces de sobrevivir en el interior de amebas y, de hecho, aunque el ADN de *Pseudoxanthomonas* spp. y *Paenibacillus* spp. ya ha sido descrito como parte del microbioma de AVL aisladas en sistemas de agua potable en Francia (Delafont y col., 2013, 2016) y de agua depurada y clorada en Sudáfrica (Conco-Biyela y col., 2024), respectivamente, esta es la primera vez que se describe su aislamiento y extracción a partir de la lisis de una ameba.

Comparando con los estudios previos mencionados, dos aspectos resaltan: una menor diversidad bacteriana en cuanto a filos y géneros, y la mayor proporción de BE gram positivas identificadas (74 de las BE identificadas, el 96 %) comparada con las gram negativas (3 aislamientos, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Pseudoxanthomonas*, que representan el 4 % de las BE identificadas), cuando normalmente suele observarse la tendencia contraria (Das y col., 2023; Evstigneeva y col., 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta varios aspectos. Por un lado, la diversidad de las BE identificadas en el presente trabajo está sesgada por las condiciones de cultivo y aislamiento: sólo bacterias aerobias de crecimiento rápido (24-48 horas) a 37 °C; y por su resistencia a antibióticos (se han identificado las BE que han mostrado un perfil de sensibilidad a antibióticos interesante). Además, cabe decir que algunas de las BE seleccionadas, a lo largo del tiempo y los subcultivos no pudieron ser identificadas, bien por contaminación de las muestras o por dejar de crecer en las condiciones de estudio. También es posible que algunas bacterias cultivables se hayan obviado durante los análisis debido a la similitud de la morfología de sus colonias con otras ya seleccionadas para evaluar su resistencia, especialmente en los casos en los que se obtuvo un gran número de BE de una misma ameba.

Se ha de destacar que se han llevado a cabo pocos estudios evaluando la microbiota del interior de amebas ambientales y, que los estudios realizados hasta la fecha que han mostrado una gran diversidad de BE, se han basado en técnicas de secuenciación genómica, en los cuales se detecta ADN que puede corresponder o no, con bacterias vivas (Delafont y col., 2013, 2016; Moreno-Mesonero y col., 2020a), o técnicas de co-cultivo, que lo que permiten es conocer la capacidad de determinadas bacterias de sobrevivir en el interior de amebas de referencia (Evstigneeva y col., 2009; Pagnier y col., 2008). En este sentido, vale la pena mencionar que se han observado

diferencias significativas al aislar microorganismos a partir de muestras reales (sean ambientales o clínicas) y en condiciones de laboratorio, lo cual ha llevado a establecer listas en las que se clasifican las BE en función de haber sido detectadas *in vivo* o *in vitro* (Balczun y Scheid, 2017). Esto refuerza el valor del presente trabajo en el que se han aislado BE presentes de forma natural en amebas aisladas de muestras ambientales.

Además, como otros autores han dejado constancia, no es fácil recuperar BE a partir de aislamientos de AVL, incluso tratándose de bacterias normalmente cultivables (Rayamajhee y col., 2022), ya que se ha visto que las bacterias ingeridas por *Acanthamoeba* pueden entrar en un estado viable pero no cultivable, requiriendo técnicas de cultivo especiales. Así les ocurrió a Casini y col. (2018) que, analizando muestras de agua en hospitales, obtuvieron un 13 % de las muestras positivas para *Legionella pneumophila* mediante técnicas de cultivo, mientras que el 66 % lo fueron mediante PCR. También puede ocurrir lo contrario, una proliferación de ciertas bacterias en condiciones cultivables que sobrestime su presencia real en el interior de las AVL, como les ocurrió a Delumeau y col. (2023) con *Microbacterium* spp. y otras bacterias, que mostraron ser poco abundantes en los análisis de secuenciación, pero muy abundantes en cultivo.

Adicionalmente, ha de tenerse en cuenta el tiempo pasado desde la toma de muestras de agua en las estaciones de muestreo hasta la extracción de las BE, el cual varía según la estación y las amebas. Durante este periodo, la microbiota de las AVL ha podido variar en gran medida; posiblemente, algunos géneros bacterianos inicialmente presentes en la ameba hayan salido de la misma a lo largo de los subcultivos y las BE presentes en mayor proporción sean capaces de reproducirse en el interior de las amebas. En este sentido es interesante señalar que, en un estudio reciente (Delumeau y col., 2023), se demostró que los diferentes subcultivos de amebas en cultivo sólido, como los realizados en el presente trabajo para el aislamiento de las amebas, hacen variar la composición de la microbiota interior de las amebas. De hecho, en este estudio, cuatro amebas aisladas (*Naegleria* sp., *N. australiensis*, *Vahlkampfia* sp. y *Paravahlkampfia ustiana*) en tres puntos de muestreo diferentes de unos baños termales naturales recreacionales, obtuvieron que, pese a la diferente biodiversidad inicial, las amebas acababan teniendo un perfil microbiológico intracelular muy similar tras diferentes subcultivos. También observaron que algunos géneros bacterianos eran más propensos a encontrarse en ciertas amebas, pero esto realmente es difícil de constatar en el presente estudio dado que se han identificado dos géneros de AVL distintos.

Por otro lado, se ha demostrado que ciertos géneros de amebas tienen sus preferencias a la hora de depredar y alimentarse de bacterias: *Acanthamoeba* parece ser generalista, depredando activamente diferentes bacterias en diferentes condiciones con similar eficiencia, mientras que otros géneros como *Vermamoeba* (no detectada en el presente estudio), parecen ser más selectivas, favoreciendo su crecimiento en determinados nichos ecológicos (Das y col., 2023). No obstante, se ha sugerido que la variabilidad ambiental (por ejemplo, de temperatura, que puede promover o atenuar la proliferación de ciertas especies tanto bacterianas como amebianas) y la especificidad huésped-hospedador son factores clave de la composición y variación de la microbiota en AVL (Delumeau y col., 2023). También es posible que ciertas bacterias muestren mayor “reticencia” a ser ingeridas; tal es el caso de una especie del género *Pantoea* capaz de producir un glicolípido biosurfactante que le permite resistir la depredación de *Dictyostelium discoideum* e, incluso, comprometer su integridad celular y lizarla (Smith y col., 2016). En esta línea, resulta relevante citar un caso de cooperación entre bacterias para defenderse de la depredación por *D. discoideum*: se ha observado que *Pseudomonas* sp. puede secretar unos lipopéptidos (siringafactinas) que estimulan la producción de peptidasas por *Paenibacillus* sp., los cuales degradan lipopéptidos y generan subproductos tóxicos para la ameba (Zhang y col., 2021).

Otro punto interesante a tener en cuenta es que las BE, una vez internalizadas, pueden interactuar en el interior de las amebas, favoreciendo o evitando la depredación/infección por otros géneros. Por ejemplo, la presencia de la bacteria *Protochlamydia amoebophila* protege a su hospedadora *A. castellanii* de la infección por *L. pneumophila* y varias especies de *Paraburkholderia* presentes en el interior de *D. discoideum*, facilitan el transporte de otras bacterias (Delumeau y col., 2023). Quizá estas interacciones podrían tener relación con la elevada presencia de bacterias gram positivas y, más concretamente, de *Staphylococcus* spp., no reportados en estudios de AVL ambientales hasta la fecha. Es sabido que *S. warneri* es capaz de producir un péptido anti-*Legionella* (Hécharde y col., 2005) con actividad bactericida y *S. epidermidis* es capaz de producir un péptido bacteriostático frente a la misma bacteria (Marchand y col., 2011). Esto podría condicionar la presencia de *Legionella* spp. en el interior de las amebas y quizás de otras gram negativas. Incluso, cabe pensar que las amebas, especialmente *Acanthamoeba*, se alimenten selectivamente de *Staphylococcus* ya que, al sobrevivir en su interior, les protegen de la infección por *Legionella*. Puesto que *Legionella* es un género bacteriano que no se puede aislar por las técnicas de cultivo empleadas, sería de gran interés evaluar en futuros estudios la presencia o ausencia de este género en las amebas con y sin estas especies de *Staphylococcus* y comprobar si existe alguna relación. No obstante, estas

interacciones entre bacterias deben de depender de donde están localizadas dentro de la ameba, ya que algunas habitan en vacuolas, mientras que otras persisten en el citoplasma (Haselkorn y col., 2021).

Otro ejemplo, podría ser la interacción entre especies de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., que se ha visto que pueden variar desde la coexistencia hasta la competencia, dependiendo de los factores ambientales y la abundancia de nutrientes (Lyng y Kovacs, 2023). Es interesante observar en los resultados que, en la única AVL y estación de muestreo en la que se detectó la presencia de *P. koreensis*, no se aisló ninguna bacteria perteneciente al género *Bacillus* y viceversa: en ninguna de las AVL ni aguas con *Bacillus* presente, se aisló *Pseudomonas*, pese a ser ambos géneros de gran abundancia en el medio ambiente. Ambos géneros bacterianos son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, muchos de ellos con actividad antimicrobiana, los cuales podrían estar interfiriendo en las relaciones intracelulares de las AVL de estudio. Según la bibliografía, *Bacillus* parece no poder defenderse si se encuentra en situaciones donde no es capaz de producir biofilm y, precisamente, se ha visto que *Pseudomonas* del grupo *fluorescens* (al que pertenece *P. koreensis*) pueden inhibirlo mediante la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos (Lyng y Kovacs, 2023). No hemos de olvidar que en el interior de las amebas pueden encontrarse otros microorganismos como hongos (Greub y Raoult, 2004) y virus que pueden influir también en la diversidad del microbioma de las AVL (Delumeau y col., 2023).

En cualquier caso, las BE identificadas han tenido que encontrarse previamente en las aguas de las zonas de muestreo para poder ser internalizadas por las AVL del estudio. De esta manera, las BE pueden servir de reflejo de la microbiota del agua, la cual puede verse influenciada por actividades antropogénicas, lo cual se discute en el Apartado IV.2.3.

Tabla IV.5. Cepas de bacterias endocitobiontes (BE) identificadas en cada estación de muestreo (EM).

ESTACIÓN	AVL	BE	IDENTIFICACIÓN
EM.1	<i>Acanthamoeba</i> T4	1111	1111.34 <i>Microbacterium paraoxydans</i>
			1113.7 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.8 <i>Bacillus cereus</i>
			1113.9 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.10 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.11 <i>Bacillus clausii</i>
	<i>Acanthamoeba</i> T4	1113	1113.12 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.13 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.14 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.15 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.16 <i>Bacillus clausii</i>
			1113.17 <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>
	ni	13	13.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>
			141.1 <i>Bacillus licheniformis</i>
		141	141.2 <i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Acanthamoeba</i> T4		141.6 <i>Bacillus licheniformis</i>
			141.7 <i>Bacillus licheniformis</i>
EM.2			142.1 <i>Micrococcus luteus</i>
	<i>Acanthamoeba</i> T4	142	142.2 <i>Bacillus licheniformis</i>
			142.8 <i>Staphylococcus warneri</i>
			211.1 <i>Microbacterium arborescens</i> *
			211.2 <i>Microbacterium arborescens</i> *
	<i>Acanthamoeba</i> T4	211	211.3 <i>Microbacterium arborescens</i> *
			211.4 <i>Microbacterium arborescens</i> *
			211.5 <i>Microbacterium arborescens</i> *
			2121.2 <i>Staphylococcus warneri</i>
			2121.3 <i>Staphylococcus warneri</i>
			2121.5 <i>Staphylococcus warneri</i>
			2121.10 <i>Staphylococcus warneri</i>
	ni	2121	2121.14 <i>Staphylococcus warneri</i>
			2121.15 <i>Staphylococcus warneri</i>
			2121.20 <i>Staphylococcus warneri</i>
			2121.21 <i>Staphylococcus warneri</i>
			2121.22 <i>Pseudoxanthomonas indica</i>
			2132.1† <i>Candida</i> sp.
			2132.2 <i>Pseudomonas koreensis</i>
<i>Acanthamoeba</i> T4			2132.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		2132	2132.4 <i>Staphylococcus pasteurii</i>
			2132.5 <i>Staphylococcus pasteurii</i>
			2132.6 <i>Kocuria rhizophila</i>
			2132.7 <i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Acanthamoeba</i> T4	2221	2221.1†	<i>Candida</i> sp.
<i>Acanthamoeba</i> T4	231	231.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

AVL: ameba de vida libre; ni: no identificada; *M. arborescens/imperiale; †: levadura.

Tabla IV.5. Cepas de bacterias endocitobiontes (BE) identificadas en cada estación de muestreo (EM).
Continuación.

ESTACIÓN	AVL		BE	IDENTIFICACIÓN
EM.3	ni	32	32.4	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	ni	35	35.1	<i>Bacillus licheniformis</i>
EM.4	ni	4412	4412.1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			4412.5	<i>Micrococcus luteus</i>
EM.5	Acanthamoeba T4	521	521.2	<i>Staphylococcus equorum</i>
			521.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
			521.6	<i>Kocuria rhizophila</i>
			521.7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
			521.9	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	Acanthamoeba T4	522	522.10	<i>Micrococcus luteus</i>
			522.12	<i>Micrococcus luteus</i>
			522.22	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
	ni	5511	5511.7	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
			5511.9	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
			5511.10	<i>Bacillus niabensis</i>
			5511.11	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
			5511.14	<i>Bacillus pumilus</i>
	Naegleria sp.	5512	5512.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
	Naegleria sp.	5521	5512.14	<i>Bacillus altitudinis</i>
			5521.11	<i>Bacillus pumilus</i>
EM.6	Acanthamoeba T4	62112	62112.1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			62112.2	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			62112.3	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			62112.4	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			62112.5	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			62112.8	<i>Staphylococcus equorum</i>
			62112.9	<i>Staphylococcus equorum</i>
	Acanthamoeba sp.	622	622.1	<i>Microbacterium arborescens</i>
	Acanthamoeba T4	643	643.1	<i>Staphylococcus warneri</i>
			643.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
			643.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
			643.4	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			643.5	<i>Staphylococcus warneri</i>
			643.6	<i>Staphylococcus warneri</i>
EM.7	ni	722	722.7	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
			722.11	<i>Paenibacillus lautus</i>

AVL: ameba de vida libre; ni: no identificada; *M. arborescens/imperiale; †: levadura.

3. IMPACTO HUMANO EN LAS POBLACIONES DE AMEBAS DE VIDA LIBRE Y BACTERIAS ENDOCITOBIONTES PRESENTES EN AGUAS SUPERFICIALES DE LA CUENCA DEL EBRO. IMPACTO Y RIESGOS ASOCIADOS

Con el objeto de evaluar el impacto de la actividad humana en las comunidades microbianas de amebas de vida libre (AVL) y bacterias endocitobiontes (BE) de ríos de la Cuenca del Ebro, se relaciona la abundancia e identificación de estos microorganismos obtenida y la actividad ganadera llevada a cabo en las áreas colindantes a las aguas superficiales evaluadas. Así mismo, se reflexiona sobre la relevancia y los riesgos asociados a los resultados obtenidos.

Características de la zona de muestreo

Las estaciones de muestreo EM.1-EM.6 elegidas para el presente trabajo, se han seleccionado por ser las estaciones de estudio del Proyecto OUTBIOTICS con mayor presión ganadera en la Cuenca del Ebro (Moles, 2021). Estas seis estaciones cuentan con una gran actividad porcina y avícola, principalmente, tal y como muestran las Figuras IV.4 y IV.5, donde aparecen denominadas como 1_ASE-6_ASE. Alrededor de varias de estas estaciones, también se desarrolla actividad bovina y cunícola, como indica la información proporcionada en la Tabla III.1. La estación de muestreo 7 (EM.7), sometida a una menor presión ganadera (Figura III.1), aunque influenciada también por el sector avícola, cunícola y bovino (Tabla III.1), se selecciona por su ubicación cercana a la ciudad de Zaragoza.

En puntos cercanos a las estaciones de muestreo evaluadas (EM.1-EM.7), la Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE) monitoriza parámetros fisicoquímicos para controlar la calidad de las aguas. Atendiendo a su cercanía, se seleccionan los siguientes puntos de control de la CHE: Canal de Serós en Lérida (situado a 16,7 km aguas arriba de EM.1 y a 16,3 km aguas abajo de EM.2, aproximadamente), río Cinca en Fraga (situado a 8,7 km aguas arriba de EM.3 y a 18,4 km aguas arriba de EM.4, aproximadamente), río Alcanadre en Ballobar (situado a 37,5 km aguas abajo de EM.5 y a 38,8 km aguas abajo de EM.6, aproximadamente) y río Gállego en Villanueva (situado en la misma EM.7).

En la Tabla IV.6 se muestran las características fisicoquímicas de las aguas superficiales en estos puntos de control de la CHE el mismo día en que se realizó el muestreo y la variabilidad de las mismas a lo largo del año. Esta información se ha obtenido a partir de la Confederación

Hidrográfica del Ebro (<https://saica.chebro.es/inicio.php>). Los datos pertenecientes al río Gállego corresponden al año 2020, momento en el que la CHE comenzó a registrar estos parámetros. Estos parámetros, junto con el dato del caudal de los ríos en el momento del muestreo (recogido en la Tabla III.1), permiten tener una idea aproximada de cómo es la zona de estudio.

Turbidez, pH y temperatura: factores que pueden influir en las poblaciones de las amebas de vida libre

En el presente trabajo, todas las aguas analizadas han resultado positivas para la presencia de amebas (100 %). Las AVL están ampliamente distribuidas en el medio ambiente y su presencia y diversidad se ha relacionado con diferentes factores, como la temperatura, el pH y, especialmente, la materia orgánica disuelta, los sólidos suspendidos y los microorganismos presentes, que sirven de alimento y promueven su proliferación (Delafont y col., 2016; Delumeau y col., 2023; Loret y Greub, 2010). La mayor o menor presencia de estos últimos, se puede inferir mediante el parámetro de la turbidez. Según los registros de la CHE (Tabla IV.6), las aguas de la zona de estudio sufren frecuentes variaciones abruptas de turbidez y, en varios casos, de conductividad. Esto puede ir asociado a la descarga de efluentes, así como a precipitaciones o períodos de sequía (Ospina-Arias y col., 2016), factores que deben de influir en las variaciones de caudal registradas en las estaciones de estudio durante las dos campañas de muestreo (Tabla III.1).

Comparando con otros estudios, Magnet y col. (2013) y Ettinger y col. (2003) también obtuvieron aislamientos de AVL en el 100 % de muestras de agua superficial, las cuales fueron tomadas en zonas con influencia de plantas de tratamiento (en Castilla, España) y de contaminación (en Virginia, Estados Unidos), respectivamente. Otros estudios, en los que no se ha relacionado la situación de las estaciones de muestreo con posibles fuentes de contaminación, revelan tasas menores; tal es el caso de García y col. (2013), Kuiper y col., (2006), Tsvetkova y col. (2004) y Javanmard y col. (2017), que obtuvieron entre un 15 y un 77 % de muestras positivas para AVL a partir de aguas superficiales de Aragón, Holanda, Bulgaria e Irán, respectivamente. Por tanto, la alta tasa de muestras positivas obtenida puede tener relación con la alta presión ganadera de las zonas de estudio seleccionadas; desde las instalaciones ganaderas pueden llegar bacterias y materia orgánica a las masas de agua colindantes por infiltración, lixiviación o escorrentía (Henriot y col., 2022), las cuales sirven de alimento para las amebas y promueven su proliferación.

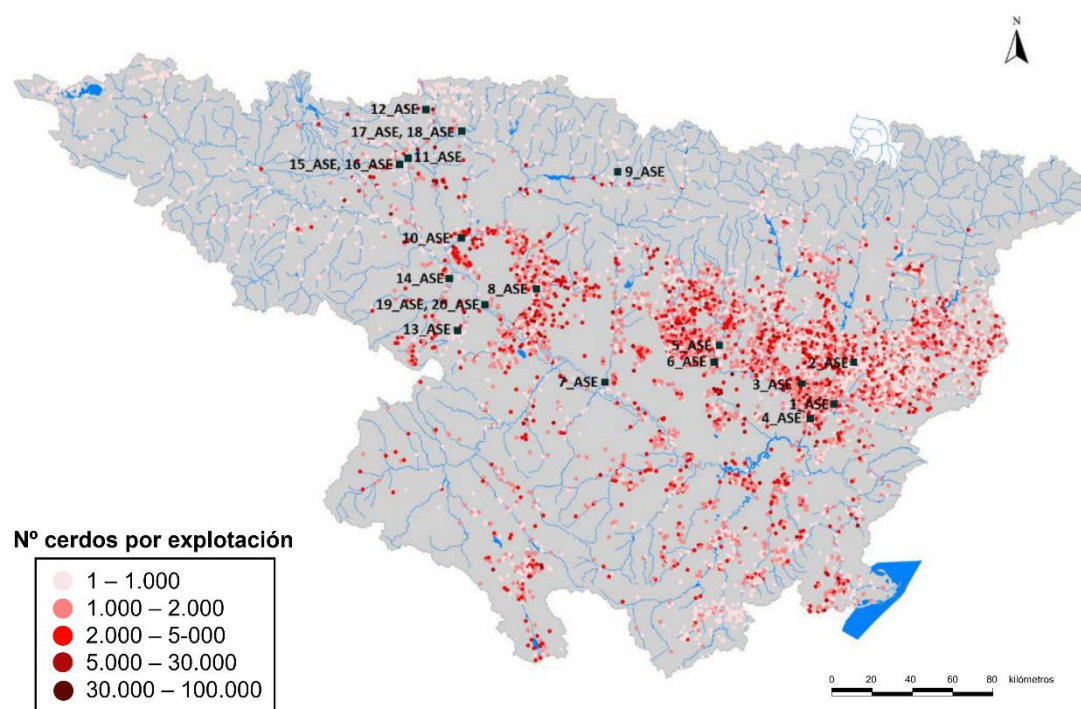


Figura IV.4. Mapa de explotaciones ganaderas porcinas en la Cuenca del Ebro y estaciones de muestreo del proyecto OUTBIOTICS. Figura adaptada de Moles (2021).

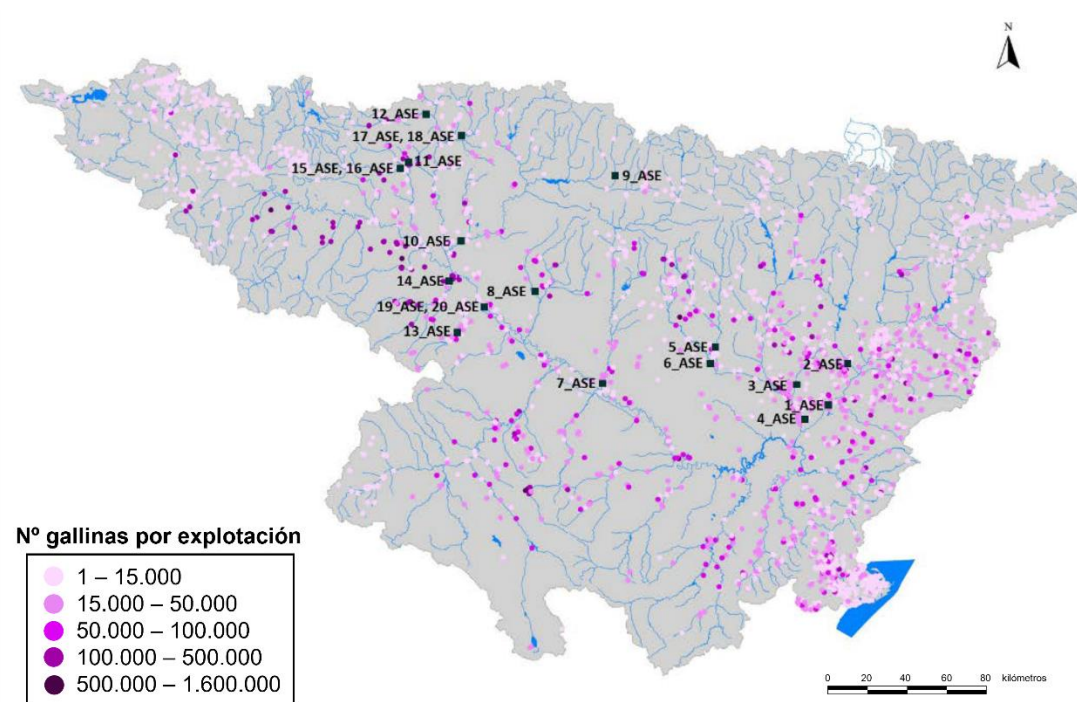


Figura IV.5. Mapa de explotaciones ganaderas avícolas en la Cuenca del Ebro y estaciones de muestreo del proyecto OUTBIOTICS. Figura adaptada de Moles (2021).

Tabla IV.6. Valores de parámetros fisicoquímicos medidos en los puntos de control de la Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE) en el momento del muestreo de la campaña 1 (C1) y la campaña 2 (C2), rango (mínimo-máximo) a lo largo del año 2018 y variaciones abruptas y repentinas (a nivel diario).

PUNTO DE CONTROL DE LA CHE	CANAL DE SERÓS (LÉRIDA)			RÍO CINCA (FRAGA)			RÍO ALCANADRE (BALLOBAR)			RÍO GÁLLEGO (VILLANUEVA ^A)		
PARÁMETRO	C1	C2	R	C1	C2	R	C1	C2	R	C1	C2	R
Temperatura (°C)	12,4	13,9	6-24	12,5	13,5	4-25	15,8	13,6	5-29	14,6	10,7	5-27
pH	8,1	8,3	7,8-8,5	-	-	-	8,1	8,4	8-8,6	8,2	8,2	7,9-8,7
Conductividad a 20 °C (μS/cm)	454	529	291-1028	541	1591	394-1837	674	851	425-1373	645	2050	522-3601
Turbidez (UNT)	38	23	3-172	42	29	2-981	83	93	5-473	36	11	2-243
Amonio (mg NH ₄ /L)	0,02	0,02	0-0,8	-	-	-	0,09	0,02	0-1,0	0,06	0,16	0-1,8
Nitratos (mg NO ₃ /L)	-	-	5-25	-	-	-	8,5	21,5	6-43	-	-	-
Nivel (cm)	226	187	0-247	-	-	-	108	62	20-246	169	139	123-215
Caudal (m ³ /s)	-	-	-	285	41	15-444	21	16	5-164	-	-	-
Variaciones abruptas	Turbidez, conductividad y amonio			Turbidez y conductividad			Turbidez y nitratos			Turbidez, conductividad y amonio		

C: campaña; O₂: oxígeno; R: rango anual (mínimo-máximo); -: no hay valores disponibles; ^aValores de 2020.

El pH puede verse especialmente modificado por determinados efluentes industriales (Mosteo, 2011), afectando e influyendo en la ecología amebiana. No obstante, parece ser estable a lo largo del año en la zona de estudio. En cuanto a la temperatura, las AVL aisladas parecen estar adaptadas a vivir en aguas que varían anualmente sus temperaturas desde los 4 °C hasta los 29 °C.

Se sabe que *Acanthamoeba*, detectada en 11 de las 14 aguas analizadas y con una prevalencia del 89 % respecto al total de AVL identificadas, es capaz de sobrevivir ante un amplio espectro de condiciones ambientales. Este género de AVL, y más concretamente el genotipo T4, es el más frecuentemente aislado en muestras ambientales, como es el caso, pero también en clínicas (Lass y col., 2017). Su potencial patogenicidad se relaciona sobre todo con la queratitis amebiana, cuya incidencia ha aumentado notoriamente durante los últimos años de la mano del incremento de personas usuarias de lentes de contacto (Rayamajhee y col., 2022). Aunque no hay zonas de baños recreacionales oficiales registradas alrededor de las zonas de estudio (Ministerio de Sanidad, 2023), es conveniente recordar el baño sin lentes de contacto a las personas usuarias de estas como medida primaria de prevención de infecciones por esta AVL. Además, como ya se ha mencionado, *Acanthamoeba* puede causar también lesiones cutáneas, pulmonares e, incluso, encefalitis (Visvesvara y col., 2007).

En cuanto a *Naegleria*, y como se ha indicado en el Apartado IV.1.2, resulta de especial relevancia la detección de *N. lovaniensis* en el río Gállego a su paso por Zaragoza (EM.7.2). Esta especie se considera termofílica (capaz de vivir a temperaturas a partir de 45 °C) y, sin embargo, en este caso demuestra ser capaz de adaptarse a vivir en un ambiente que, según el momento del año oscila entre la mesofilia (25-35 °C) y la psicofilia (hasta -5 °C). Si bien es verdad que en el medio ambiente puede encontrarse en forma quística y, en las condiciones favorables de laboratorio, proliferar, se ha de remarcar que las técnicas empleadas en el presente estudio favorecen el aislamiento de las AVL que se encuentran de forma más abundante en las aguas de estudio. A esto, cabe añadir que la presencia de esta especie suele estar ligada a la de *N. fowleri* (De Jonckheere, 2014) y, dado que por la metodología empleada no se puede asegurar la ausencia de esta última en la zona de estudio, los resultados obtenidos subrayan la necesidad e importancia de vigilar las poblaciones de AVL de forma periódica. Esto permitiría prevenir posibles brotes e infecciones por esta letal ameba que, recientemente, afectó a una niña en Toledo tras bañarse en una piscina infectada (Ruiz-Ginés y col., 2019).

Nitratos: un posible factor de impacto de la ganadería en la población de amebas de vida libre

El ciclo del nitrógeno implica que amonio, nitrito y nitrato, las formas iónicas más comunes de nitrógeno inorgánico disuelto, suelen estar presentes de forma natural en ecosistemas acuáticos. Sin embargo, durante las últimas décadas, la actividad humana ha afectado sustancialmente este ciclo, introduciendo y aumentando la concentración de nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos (Camargo y Alonso, 2006), convirtiéndose en una de las principales fuentes de contaminación del agua (Wu y col., 2023).

En los puntos de control de la CHE situados en el Canal de Serós a su paso por Lérida y en el río Alcanadre a su paso por Ballobar (puntos cercanos a las EM.1, EM.2, EM.5 y EM.6) destacan los valores de nitratos y su variación anual (Tabla IV.6). El aumento de nitratos en ecosistemas acuáticos está altamente relacionado con actividades ganaderas y agrícolas que, bien por escorrentía, lixiviación o infiltración, acaban contaminando las aguas superficiales colindantes. Este factor, por tanto, puede influir en las comunidades microbianas de las EM.1, EM.2, EM.5 y EM.6 mediante el florecimiento de microalgas que conlleva la eutrofización y acidificación del ecosistema (Camargo y Alonso, 2006; Martín y col., 2024). Las AVL también se alimentan de microalgas (Rodríguez-Zaragoza, 1994) y, por tanto, cabe pensar que la población amebiana puede proliferar especialmente ligada a este factor.

En este sentido, resulta interesante observar que, en el muestreo de la primera campaña, aunque el número de aislamientos es bastante homogéneo, con un promedio de 8 aislamientos en cada estación evaluada, en el segundo muestreo, el río Noguera Ribagorzana a su paso por Corbins (EM.2.2) y el río Flumen en Albalatillo (EM.6.2) destacan con 10 y 11 aislamientos respectivamente (Tabla IV.1), coincidiendo con zonas de alta emisión de nitratos. En la segunda campaña, la EM.2.2 vuelve a ser una de las que más aislamientos de AVL obtiene, junto con la EM.5.2, otra zona posiblemente afectada por la emisión de nitratos. Sorprende el elevado número de aislamientos (17) en el río Clamor Amarga en Zaidín (EM.3.2), lo cual podría deberse a una proliferación relacionada con los frecuentes aumentos de turbidez, aunque con la información disponible no se pueden establecer relaciones claras. Las altas cantidades de aislamientos obtenidos en las EM.2.2 y EM.3.2 podrían también atribuirse al pequeño caudal de los ríos Noguera Ribagorzana y Clamor amarga, respectivamente, que en otoño y tras un período de lluvias, provocaran el aumento de caudal (Tabla III.1) y un consecuente aumento de turbidez que derivara en la proliferación de AVL.

Comparación entre las campañas de muestreo: primavera y otoño

Según estudios previos, la abundancia de géneros de las AVL puede variar a lo largo del tiempo debido a diversos factores como el clima, cambios en la composición del agua y la época del año, los cuales pueden influir en las dinámicas de las poblaciones y hábitat de las AVL (Fernández, 2014; Greub y Raoult, 2004; Rodríguez-Zaragoza, 1994). Por ejemplo, Ettinger y col. (2003) encontraron que en el río James (Virginia, Estados Unidos), las poblaciones de *Naegleria* y *Acanthamoeba* predominaban más en primavera, mientras que *Vannella*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba* eran más comunes en otoño. Sin embargo, aún no se ha podido establecer una tendencia clara relativa a las estaciones (Gomes y col., 2020; Loret y Greub, 2010; Magnet y col., 2013; Muchesa y col., 2018).

En el presente estudio, al comparar los resultados de las dos campañas (Tabla IV.1), se puede observar que la alta proporción de cepas de *Acanthamoeba* spp. en relación al total de AVL aisladas en los ríos Segre y Noguera Ribagorzana (EM.1 y EM.2) se mantiene en la segunda campaña (75 % tanto en EM.1.1 como EM.1.2, 60 % y 50 % en EM.2.1 y EM.2.2, respectivamente). Asimismo, la menor proporción observada en los ríos Clamor Amarga y Alcanadre (EM.3 y EM.5) también se mantiene en ambas campañas (38 % y 24 % en EM.3.1 y EM.3.2, y 33 % y 36 % en EM.5.1 y EM.5.2, respectivamente). Además, se han aislado cepas de *Acanthamoeba* filogenéticamente idénticas en la EM.2.1 y EM.2.2 (Figura IV.1).

Respecto a este género, destaca que 14 cepas han resultado ser filogenéticamente la misma especie, presente en los ríos Segre (EM1.1), Noguera Ribagorzana (EM.2.1 y EM.2.2), Clamor Amarga (EM.3.2), Alcanadre (EM.5.1) y Flumen (EM.6.1). Por tanto, esta especie de *Acanthamoeba* parece ser endémica de la Cuenca del Ebro, al menos en la zona de alta presión ganadera de las provincias de Huesca y Lérida. Ha de tenerse en cuenta que se han filtrado únicamente 500 mL de agua y, por tanto, las AVL crecidas son las más predominantes y/o las que mejor se adaptan y proliferan en condiciones de laboratorio. Por su parte, en el río Gállego (EM.7) se ha detectado *Naegleria* en ambas campañas y, de hecho, los aislamientos de *N. australiensis* detectados en EM.7.1 y EM.7.2 han demostrado pertenecer a la misma cepa (100 % de identidad de las secuencias), lo que indicaría que estas amebas están asentadas en la zona estudiada. Es posible que estas amebas habiten en biofilms del lecho de estos ríos y se vayan desprendiendo por erosión o efectos del flujo (Donlan, 2002).

La detección de *N. lovaniensis*, especie reconocida como termófila, en el río Gállego en la campaña de otoño (EM.7.2) podría indicar su presencia quística durante el año (o en menor proporción) y su proliferación durante la época estival debido al aumento de la temperatura

ambiental y del agua. Sería interesante y beneficioso llevar a cabo futuros estudios que evalúen la presencia de AVL a lo largo del tiempo para entender con mayor profundidad la ecología y dinámica estacional de las especies amebianas; esto permitiría identificar mejor las posibles amenazas para la salud y facilitar la implementación de medidas preventivas.

Relevancia y riesgos asociados a las amebas de vida libre detectadas

Las AVL detectadas en el presente estudio pueden llegar a las estaciones de tratamiento de aguas potables (ETAP) de poblaciones situadas aguas abajo de los puntos de muestreo. En ellas, pueden sobrevivir fácilmente a los procesos de potabilización gracias a su estadio de quiste (Loret y Greub, 2010), especialmente *Acanthamoeba*, el género que ha demostrado mayor resistencia a los tratamientos de desinfección hasta la fecha (Thomas, 2013). Diversos estudios han documentado en repetidas ocasiones la presencia de géneros de amebas como *Acanthamoeba*, *Naegleria* o *Vermamoeba* en varias ETAP, demostrando su supervivencia a los procesos de desinfección y su posterior colonización de los sistemas de distribución de agua potable, desde donde pueden entrar en contacto con la población (Corsaro y col., 2010; Loret y Greub, 2010; Thomas y col., 2008). El 89 % de las AVL identificadas corresponden a amebas potencialmente patógenas, lo que puede poner en riesgo a las personas expuestas, especialmente y como ya se ha mencionado a aquellas usuarias de lentillas, aunque vale la pena recordar que *Acanthamoeba* puede causar también otras infecciones y cuadros clínicos (Visvesvara y col., 2007). Por ello, conocer la ecología amebiana de las aguas naturales permite tomar medidas de prevención y precaución para evitar brotes e infecciones.

En este punto, ha de tenerse en cuenta que el cultivo es una técnica limitante que subestima la diversidad y densidad de las AVL (Goñi y col., 2014) y que subcultivar favorece la pérdida de cepas aisladas (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Además, existen otras especies de amebas de especial interés clínico, como *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* o *Paravahlkampfia francinae* que, al igual que la ya mencionada, *N. fowleri*, no son capaces de crecer en las condiciones de cultivo establecidas y, por ello, no puede garantizarse su ausencia (García y col., 2011). Por tanto, es recomendable realizar estudios posteriores aplicando metodologías capaces de detectar un rango más amplio de géneros de AVL, particularmente tras el primer caso nacional de infección por *N. fowleri* y tras haberse detectado a *B. mandrillaris* en varios ambientes acuáticos en España (Gomes y col., 2020; Magnet y col., 2013). Además, cabe pensar que la tendencia de aumento de temperaturas debido al cambio climático puede promover la

proliferación y diseminación de cepas termofílicas, como *N. fowleri* (Fernández, 2014) y *Vermamoeba vermiformis* (Delafont y col., 2018).

Aun así, el mayor riesgo relacionado con la presencia de AVL en sistemas de agua, más que su propia patogenicidad potencial, es su capacidad de transportar, diseminar y proteger microorganismos patógenos en su interior, los cuales pueden liberarse lisando la ameba e infectar a las personas expuestas (Guimaraes y col., 2016). Especial riesgo de contagio por bacterias endocitobiontes se ha determinado en torres de refrigeración, piscinas o sistemas de distribución hospitalarios (Berk y col., 2006; Fernández, 2014; Rohr y col., 1998). De hecho, cada vez más estudios demuestran la supervivencia y recolonización tras episodios de desinfección por parte de bacterias patógenas en sistemas de distribución, hospitales y centros de salud gracias a la protección otorgada por amebas, siendo el caso más ampliamente conocido el de *Legionella pneumophila* (Cateau y col., 2014; Loret y Greub, 2010; Tovar, 2006). Debido a esto, es importante conocer no sólo las poblaciones de AVL en entornos naturales, sino también la de las bacterias endocitobiontes potencialmente patógenas que pueden ser transportadas y protegidas hasta sistemas de agua artificiales.

Factores influyentes en la presencia de bacterias endocitobiontes en las AVL de estudio

Atendiendo a los resultados plasmados en la Tabla IV.5, se puede observar que en todas las aguas superficiales analizadas se han obtenido BE. Destacan EM.5.1 (río Alcanadre), EM.1.2 (río Segre) y EM.2.2 (río Noguera Ribagorzana), por haberse aislado BE en el 100 % de los cultivos evaluados; así como EM.5.1 y EM.1.1 por presentar una mayor ratio de aislamientos de BE por número de AVL positivas para BE, con 114 y 77 cepas de BE aisladas a partir de 6 AVL, respectivamente. Estas estaciones de muestreo coinciden con las zonas de elevada presencia de nitratos (Tabla IV.6).

Al igual que a estas zonas llegan nitratos de las áreas colindantes (bien por escorrentía, lixiviación o infiltraciones), también pueden llegar bacterias y otros microorganismos que forman parte de la microbiota del ganado, el suelo, sus alimentos o desechos (purines y estiércol). De hecho, junto con la descarga de efluentes municipales, las actividades ganaderas y agrícolas, así como la emisión de productos de desecho orgánicos, constituyen algunas de las principales fuentes de liberación de patógenos oportunistas a los ecosistemas acuáticos (Semenov y col., 2009). De esta forma, las explotaciones ganaderas de la zona podrían impactar aumentando la comunidad

bacteriana en el área de estudio, lo cual justificaría la elevada tasa de AVL con BE en su interior (65 %), así como la gran cantidad de BE aisladas a partir de estas AVL.

Por su parte, EM.3.1 (río Clamor Amarga) y EM.4.1 (río Cinca), destacan por tener las menores ratios de crecimiento de BE a partir de AVL evaluadas (2 de 8 y 1 de 6, respectivamente), así como menor número de BE aisladas del interior de AVL (10 y 5 BE, respectivamente). La abundancia de *Acanthamoeba* podría también influir en la tasa de AVL portadoras de BE y en la cantidad de estas BE, ya que las EM.3.1 y EM.4.1 presentan proporciones de *Acanthamoeba* menores (38 % y 33 %) en comparación con EM.1.1 y EM.2.1 (75 % y 60 %). Sin embargo, los resultados sugieren que la contaminación por emisiones ganaderas y agrícolas tiene un mayor impacto, independientemente de la proporción de *Acanthamoeba*, ya que EM.5.1, afectada por la emisión de nitratos, presentaba uno de los menores ratio de esta ameba (33 %) y, a su vez, una de las mayores tasas de AVL portadoras de BE. Adicionalmente, el hecho de que EM.3.1 y EM.4.1 tengan los menores caudales del muestreo (Tabla III.1) podría influir también en las menores tasas de BE aisladas en estas zonas de estudio.

En relación con este género, se ha de resaltar que, de las 35 *Acanthamoeba* a las que se les realiza el proceso de lisis, crecieron BE en 23 de las extracciones, lo que implica que el 66 % de las *Acanthamoeba* portaban en su interior BE cultivables bajo las condiciones establecidas. Este porcentaje es mucho mayor al frecuentemente reportado en bibliografía, que se encuentra en torno al 25 % (Rayamajhee y col., 2022), reforzando la hipótesis del impacto ganadero en la elevada presencia de BE. Respecto a las *Naegleria*, se obtuvieron BE a partir de los dos aislamientos a los que se les sometió al proceso de lisis; sin embargo, debido al tamaño limitado de la muestra, no es posible realizar una comparación significativa con estudios previos.

Ha de tenerse en cuenta que las BE aisladas son aquellas capaces de crecer en medio nutritivo, en condiciones aerobias a 37 °C tras 24-48 horas. Es posible que las AVL del presente estudio contengan BE en su interior que no cumplan estas condiciones de cultivo, como *Legionella* o *Mycobacterium*, dos de los géneros de BE más frecuentemente detectadas en el interior de amebas (García y col., 2013) y que, por tanto, esté subestimada la microbiota de las amebas del estudio.

Patogenicidad y riesgos de las de bacterias endocitobiontes aisladas

En el presente trabajo, se han aislado un total de 56 BE patógenas pertenecientes a las especies (en orden de prevalencia) *Staphylococcus warneri*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *Bacillus licheniformis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Micrococcus luteus*, *Kokuria rhizophila*, *B. pumilus*,

B. cereus, *Paenibacillus glucanolyticus*, *P. lautus*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas koreensis*, que suponen el 73 % de las BE identificadas, las cuales, previamente han sido seleccionadas por su resistencia a antibióticos (Capítulo IV). Algunas de estas especies, se sabe que pueden incluso multiplicarse en su interior (Cardas y col., 2012). Estas bacterias, como se ha descrito en el Apartado IV.2.2, causan patogenicidad especialmente en personas inmunodeprimidas, en ambientes hospitalarios (varias se han descrito como causantes de enfermedades nosocomiales) y, con frecuencia, se han relacionado con catéteres, bacteremias o afecciones pulmonares. Por tanto, su transporte y diseminación a través de los sistemas de distribución de agua, gracias a la protección de las amebas de vida libre, hasta hospitales y centros de salud u otros posibles focos infectivos, suponen un riesgo para la salud pública.

En total, el 86 % (19 de 22) de las AVL estudiadas a este nivel es portadora de BE de relevancia clínica, lo que reitera el riesgo de estos microorganismos considerados como “caballos de Troya” (Cateau y col., 2014). Especial mención merecen las AVL portadoras de *S. epidermidis*, ya que se han detectado coinfecciones *S. epidermidis* + *Acanthamoeba* en casos de queratitis amebiana (Jiang y col., 2015); concretamente 5 AVL portan en su interior a esta bacteria y 4 de ellas son *Acanthamoeba*. Esta combinación supone por tanto un especial riesgo para la salud pública. *Paenibacillus glucanolyticus* también puede causar queratitis (Hassan y col., 2021); esta especie se ha aislado de la cepa *Acanthamoeba* T4 1113, por lo tanto, y aunque no se haya reportado hasta la fecha, podría también llegar a ocasionar casos de coinfección en personas expuestas.

Adicionalmente, es importante tener en mente que, aunque algunas AVL aisladas porten en su interior BE no identificadas como patógenas, estas bacterias pertenecen a géneros en los que otras especies sí lo son. Atendiendo a la tendencia de aumento de nuevas especies patógenas y los casos de zoonosis (Sánchez y col., 2022), no se puede descartar que estas especies lleguen a serlo, en determinadas condiciones, en un futuro próximo. Paralelamente, se ha de subrayar que la supervivencia en el interior de AVL indica que estas bacterias han desarrollado sistemas de adaptación a la vida intracelular y de evasión de depredación celular. Teniendo en cuenta la elevada similitud entre amebas y macrófagos, la capacidad de sobrevivir intracelularmente se considera un factor de virulencia de estas BE (Guimaraes y col., 2016; Rayamajhee y col., 2022). Inclusive, se ha observado que, durante estos procesos intracelulares, la virulencia tanto de la ameba como de la bacteria se puede ver aumentada (Fritsche y col., 1998; Guimaraes y col., 2016), lo cual, reitera la importancia de realizar estudios de vigilancia ambiental.

Influencia de la actividad ganadera en la microbiota de las amebas de vida libre

La mayoría de las especies bacterianas identificadas se han detectado previamente en animales de ganadería porcina, avícola, cunícola, bovina, caprícola y/o equina. Tras el lavado de establos, episodios de precipitaciones, infiltración y lixiviación de purines y estiércol, estas bacterias pueden llegar a los ecosistemas acuáticos colindantes (Henriot y col., 2022), donde las AVL pueden alimentarse e internalizar algunas de ellas.

Para evaluar el posible impacto de la actividad ganadera en la diversidad de las BE transportadas por las AVL aisladas en el presente estudio, se ha elaborado la Figura IV.6. En ella, se han integrado, por un lado, los resultados relativos a la identificación de las BE y, por otro, la detección de estas especies bacterianas en diferentes explotaciones ganaderas según estudios previos (De la Cruz y col., 2024; Fernández-Fernández y col., 2023; Jan y col., 2011; Pekala y col., 2018; Porcellato y col., 2023; Ramlucken y col., 2020; Savini y col., 2010; Sun y col., 2020; Tardón y col., 2021; Vissers y col., 2007; Yadav y Khosla, 2021), teniendo en cuenta la presión porcina, avícola, cunícola y bovina de cada estación de muestreo evaluada (indicada en la Tabla III.1).

Atendiendo a la Figura IV.6, se observa un porcentaje significativo de BE presentes en las AVL de estudio que podrían encontrarse en las aguas superficiales de ríos, según el tipo de presión ganadera colindante. Concretamente, esta asociación se confirma en el 76 % de los casos (28 de 37 asociaciones). Cuatro de los casos que no reflejan esta relación (representados por una “X” en fondo blanco) corresponden a especies del género *Bacillus*. Estas especies no han sido tan ampliamente investigadas en términos de su diseminación en distintos ambientes, ya que su estudio se ha centrado principalmente en sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (Jagadeesan y col., 2024).

Si bien es verdad que la mayoría de las bacterias identificadas son consideradas ambientales y que las especies del género *Bacillus* (excepto *B. altitudinis*), *K. rhizophila*, *M. luteus*, *P. agglomerans* y *P. koreensis* se han detectado en peces (El-Rhman y col., 2009; Lau y col., 2024; Pekala y col., 2018; Savini y col., 2010; Sun y col., 2010; Tardón y col., 2021; Yousefi y col., 2022), la asociación obtenida es considerable, especialmente, en el caso de *Staphylococcus*. Casi la mitad de las BE identificadas (el 44 %, 34 de 77) pertenecen a este género bacteriano, el cual, pese a su amplia distribución en diversos ambientes y hasta donde la autora conoce, no había sido relacionado de una forma tan clara y contundente con amebas de vida libre ambientales. La presencia de varias especies, además, coincide con las estaciones de muestreo donde se detectan emisiones de nitratos, reforzando la hipótesis de que las actividades ganaderas de la zona impactan los ecosistemas acuáticos colindantes mediante la liberación y diseminación de

microbiota. Esto podría inclusive explicar la alta proporción de bacterias gram positivas detectadas en el presente trabajo, en comparación con otros estudios (Evstigneeva y col., 2009).

BE identificadas	Estaciones de muestreo						
	EM.1	EM.2	EM.3	EM.4	EM.5	EM.6	EM.7
<i>B. altitudinis</i>					X		
<i>B. cereus</i>	X						
<i>B. clausii</i>	X						
<i>B. licheniformis</i>	X		X				
<i>B. niabensis</i>					X		
<i>B. pumilus</i>					X		
<i>K. rhizophila</i>		X			X		
<i>M. paraoxydans</i>	X				X		
<i>M. arborescens/imperiale</i>		X				X	
<i>M. luteus</i>	X		X	X	X		
<i>P. glucanolyticus</i>	X						
<i>P. lautus</i>							X
<i>P. agglomerans</i>		X					
<i>P. koreensis</i>		X					
<i>P. indica</i>		X					
<i>S. epidermidis</i>	X	X			X	X	
<i>S. equorum</i>					X	X	
<i>S. pasteurii</i>		X	X	X	X	X	X
<i>S. warneri</i>	X	X				X	

Figura IV.6. Relación entre las bacterias endoítobiontes (BE) identificadas y las explotaciones ganaderas que ejercen presión en cada estación de muestreo de estudio (EM). (Las “X” representan la identificación de la especie bacteriana en la EM correspondiente. Las zonas sombreadas indican el riesgo de presencia de estas especies bacterianas, según la bibliografía, en función de la presión ganadera (porcina, avícola, cunícola o bovina) ejercida sobre la estación de muestreo).

Las especies pertenecientes a este género detectadas en el presente estudio (*S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. pasteurii* y *S. warneri*) han sido previamente aisladas a partir de ganado bovino, avícola, porcino y cunícola, según la bibliografía. De hecho, resulta claramente representativo que, recientemente, se detectó *S. epidermidis* y *S. pasteurii* en cerdos de granjas porcinas en Aragón (Abdullahi y col., 2023). *Staphylococcus equorum* también se encuentra frecuentemente en la microbiota de porcinos (Fernández-Fernández y col., 2023). Por otro lado, *S. epidermidis* secreta una proteína extracelular capaz de proteger a los embriones de pollo del virus de la influenza y se ha sugerido que puede proteger también de la infección por virus bovino al estar presentes en las fosas nasales de estos animales (De la Rosa-Ramos y col., 2021). Las cuatro especies también se han detectado en piel, heridas y abscesos de conejo (Schwab y col., 2024), así como en ganado caprino, ovino y equino (Fernández-Fernández y col., 2023). Además, un estudio reciente (Roy y col., 2024) ha demostrado que las mismas cepas de *S. aureus* (el principal

patógeno y la especie más estudiada de este género) presentes en ganado, se diseminan y contaminan comederos, alcantarillas y sistemas de drenaje en granjas.

La EM.5 destaca por cumplir en menor grado la asociación establecida. Esto podría indicar que en el río Alcanadre, a su paso por Sariñena, están interviniendo otros factores en la diversidad de las BE de las AVL. Concretamente, los resultados parecen señalar que esta zona podría estar teniendo impactos relativos a la agricultura, ya que todas las especies bacterianas no relacionadas con la ganadería, sí se han aislado en rizomas o se consideran endófitas⁹ (Gua y col., 2020; Kandasamy y Kathirvel, 2023; Kovacs y col., 1999).

⁹ Endófito: organismo capaz de vivir en el interior de plantas.

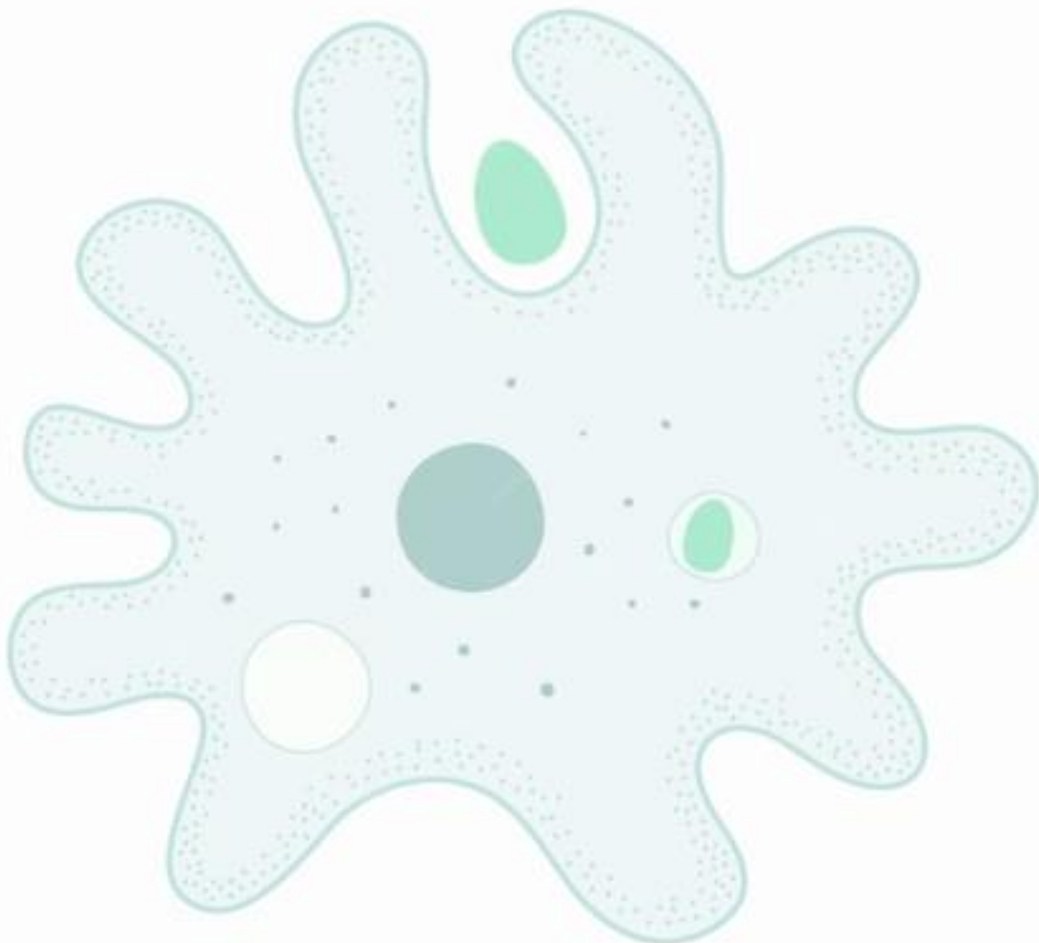
4. PRINCIPALES CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO IV

A continuación, y en base a los objetivos planteados (Capítulo II), se describen las conclusiones del presente capítulo:

- Se han aislado amebas de vida libre en todas las aguas superficiales de la Cuenca del Ebro analizadas, consiguiendo identificar el 45 % de los aislamientos. El 89 % de estos pertenecen al género *Acanthamoeba* y el 11 % a *Naegleria*.
- El 100 % de las *Acanthamoeba* identificadas a nivel de genotipo pertenecen al genotipo T4. Tanto estas, como las no identificadas a este nivel, se consideran potencialmente patógenas y de relevancia para la salud pública. La proporción de *Acanthamoeba* en las zonas de estudio se mantiene en las dos campañas de muestreo.
- Se detecta la presencia de *Naegleria lovaniensis* y *N. australiensis*, especies estrechamente relacionadas con *N. fowleri*, en las aguas superficiales del río Gállego a su paso por Zaragoza. La cepa *N. australiensis* se detecta en las dos campañas de estudio, señalando su asentamiento en este hábitat.
- Se han extraído BE a partir del 65 % de las AVL estudiadas. Se han identificado 77 BE de especial interés por su perfil de resistencias. Estas BE pertenecen a 19 especies de 9 géneros distintos, de los filos *Firmicutes* (73 %), *Actinomycetota* (23 %) y *Proteobacterias* (4 %). El género identificado con mayor prevalencia es *Staphylococcus* (44 %).
- El 86 % de las AVL seleccionadas por transportar en su interior BE con perfil de resistencia de interés son portadoras de BE de relevancia clínica. Además, cuatro de las *Acanthamoeba* aisladas son portadoras de *S. epidermidis*, un factor de riesgo para coinfecciones en queratitis amebiana.
- El elevado número de aislamientos amebianos, la elevada presencia de BE y las especies identificadas en el interior de las amebas procedentes de la Cuenca del Ebro, sugieren la influencia de las actividades humanas en la microbiota y ecología de las amebas de vida libre y sus bacterias endocitobiontes.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN RELATIVOS AL PAPEL DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE COMO RESERVORIO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS



1. ESTUDIO FENOTÍPICO DEL PERFIL DE RESISTENCIAS DE LAS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES CON ÉNFASIS EN ANTIBIÓTICOS AMINOGLUCÓSIDOS

Con el objeto de evaluar los perfiles de resistencia a antibióticos de las bacterias endocitobiontes (BE), aisladas de las amebas de vida libres (AVL) presentes en las aguas de ríos de la Cuenca del Ebro en puntos con presión ganadera, se realizan antibiogramas disco-placa a una selección de 130 BE. Posteriormente, se identifican las cepas de mayor interés (resultados mostrados en el Capítulo IV) y se evalúa su perfil de resistencia y sensibilidad frente a diferentes familias de antibióticos. Adicionalmente, y con el objetivo de evaluar la influencia de las actividades ganaderas en las resistencias encontradas, se profundiza en la familia de los antibióticos aminoglucósidos. Para ello, se determina la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de las BE más interesantes y se complementa el perfil de resistencias a esta familia de antibióticos con antibiogramas disco-placa para 12 aminoglucósidos diferentes.

1.1. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Para la evaluación del fenotipo de resistencias de las bacterias endocitobiontes (BE) aisladas, se realizan antibiogramas disco-placa a un total de 130 BE, procedentes de las EM.1.1-EM.7.1 y EM.1.2. Esta selección agrupa, por un lado, aquellas BE capaces de crecer en medio selectivo (13 cepas se aislaron a partir de medio MH con ampicilina, 13 cepas en medio MH con apramicina y 5 cepas en medio MH con gentamicina) y aquellas que presentan una morfología diferente entre las bacterias aisladas en medio no selectivo. El antibiograma se realiza para un panel general de 16 antibióticos que incluye las familias de antibióticos más utilizadas: betalactámicos (AMP, OX) y cefalosporinas (CRO), aminoglucósidos (AP, H, GM, K, ST), macrólidos (AZM, E), quinolonas (NAL, CIP), tetraciclinas (MNO), anfenicoles (CL), rifamicinas (RA) y asociación de sulfamida y diaminopirimidina (SXT), tal y como se describe en el Apartado III.3.2.1. Los halos (mm) obtenidos se muestran en el Anexo I.

Atendiendo a los resultados, el 98,5 % de las BE (128 de 130) mostraron crecimiento en presencia de al menos uno de los antibióticos evaluados y el 33 % crecieron en presencia de cinco o más antibióticos. Además, varias cepas provenientes del río Segre (EM.1.1) y Alcanadre (EM.5.1) crecieron en presencia de más de 10 de los 16 antibióticos evaluados. Según Martínez (2003), el 90 % de las bacterias presentes en el agua son resistentes a un antibiótico y el 20 % al menos a cinco. De forma similar, en el País Vasco, se detectó que el 92 % de las bacterias

aerobias aisladas en puntos de toma de agua para potabilizar del río Nervión presentaban resistencia al menos a uno de los antibióticos evaluados (Pérez y col., 2022). Según dicho estudio, la mayor o menor sensibilidad a los antibióticos está condicionada por el origen de la bacteria, razón por la cual es más probable encontrar cepas resistentes entre bacterias de origen fecal, como *Escherichia coli*, que entre bacterias ambientales. Sin embargo, en el presente estudio los resultados muestran tasas superiores, asemejándose a los valores observados en bacterias coliformes aisladas de ríos impactados por descargas de depuradoras, fábricas de fármacos u otras actividades humanas (Amato y col., 2021; Pérez y col., 2022; Sidrach-Cardona y col., 2014). No obstante, es necesario identificar las BE para poder determinar su sensibilidad o resistencia a los antibióticos evaluados ya que, dependiendo del género y especie, pueden presentar diferente sensibilidad o resistencias intrínsecas a determinados antibióticos.

Clasificación R/I/S

Una vez realizados los antibiogramas disco-placa, se selecciona un conjunto de 83 BE para su identificación en función de tres criterios: (1) por crecer en presencia de algún aminoglucósido distinto a la higromicina (dada la alta proporción de cepas capaces de crecer en presencia de este antibiótico, no se utilizó como criterio selectivo), (2) por haberse aislado a partir de medio selectivo con antibiótico y (3) por encontrarse en el interior de AVL con otras BE que cumplieran los criterios (1) y/o (2). Algunas de las cepas seleccionadas, pese a su interesante perfil de resistencia a aminoglucósidos, no pudieron ser identificadas (2121.7) ni estudiarse en mayor profundidad (1111.39, 32.5, 642.1) debido a que no pudieron sembrarse; otras cepas resultaron ser levaduras (como se indica en el Capítulo IV) y sus antibiogramas no se recogen en la tabla del Anexo I. Por tanto, se evaluó la sensibilidad a antibióticos a un total de 77 BE, las cuales, proceden de las EM.1-EM.7, siguiendo la metodología descrita en el Apartado III.3.2.3. Al pertenecer todas las BE del estudio a la primera campaña (primavera de 2018), de aquí en adelante, se omite la distinción de campañas realizada en el Capítulo IV.

Las BE seleccionadas se identificaron tal y como se desarrolla en el Capítulo IV y se categorizaron como susceptibles (S), susceptibles a exposición aumentada (I) o resistentes (R) a los antibióticos evaluados tal y como se indica en el Apartado III.3.2.3. Ha de puntualizarse que, los antibióticos que presentan puntos de corte en las guías empleadas (CLSI, 2015, 2020; EUCAST, 2024), son los recomendados para tratamientos terapéuticos y no todos aquellos para los que los diferentes géneros bacterianos pueden tener resistencias adquiridas.

El número de bacterias resistentes a cada antibiótico y a cada familia se muestra en la Tabla V.1 y los perfiles de resistencia obtenidos, clasificados por géneros y especies, se muestran en la Tabla V.2 (incluyendo las correcciones que se detallan en el Apartado 1.2 del presente capítulo). Puede observarse que la resistencia a aminoglucósidos fue la más prevalente en todas las aguas superficiales analizadas, aunque ha de tenerse en cuenta que es la familia para la que más antibióticos se evaluaron. Destaca la alta tasa de bacterias capaces de crecer en presencia de higromicina (95 % de las BE evaluadas), no registrada en ningún otro estudio. Aun descontando la resistencia a higromicina, 48 BE (62 %) son resistentes a esta familia de antibióticos, una tasa mayor a la detectada en otros estudios realizados en ríos de España, Francia o la India (Amato y col., 2021; DebMandal y col., 2011; Servais y Passerat, 2009; Sidrach-Cardona y col., 2014). No obstante, cabe señalar que la resistencia a aminoglucósidos no se evalúa con tanta frecuencia en ríos, pues muchos estudios se centran en betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas (Amato y col., 2021; Pérez y col., 2022; Rodríguez-Mozaz y col., 2015).

Después de los aminoglucósidos, las resistencias a betalactámicos y macrólidos fueron las más prevalentes: 65 (84 %) y 47 (61%) BE mostraron resistencia a estas familias, respectivamente. Se trata de dos de las familias de antibióticos empleadas con mayor frecuencia, tanto en terapia humana como ganadera, por lo que cabe esperar que lideren la prevalencia de resistencias, como se ha demostrado en estudios realizados en agua de río en Francia, Valencia, País Vasco o León, donde se han encontrado tasas de hasta el 100 % de bacterias resistentes a ambas familias (Amato y col., 2021; Pérez y col., 2022; Servais y Passerat, 2009; Sidrach-Cardona y col., 2014).

La resistencia a quinolonas también está presente en todas las aguas superficiales evaluadas, aunque el porcentaje de BE resistentes es menor (34 %). La mayoría de las cepas resistentes a quinolonas mostraron resistencia a ácido nalidíxico y tan sólo 6 BE resultaron resistentes a la fluoroquinolona ciprofloxacino (8 %). El ácido nalidíxico es una quinolona de primera generación especialmente empleada frente a enterobacterias; no suele evaluarse frente a bacterias gram positivas porque suele considerarse no efectivo al generarse resistencia tras la exposición gradual al mismo (Alós, 2019; Sierra, 2005). Sin embargo, atendiendo a los resultados obtenidos, parece que esta resistencia no es tan frecuente en muestras de carácter ambiental y podría ser dependiente de especie, ya que todas las cepas de *Micrococcus luteus* y casi todas las cepas de *Microbacterium* spp., *Staphylococcus pasteurii* y *S. equorum* presentan resistencia a este antibiótico, mientras que la mayoría de las cepas de *Bacillus* sp., *S. epidermidis* y *S. warneri* se muestran sensibles. En el caso de ciprofloxacino, cabe esperar mayor sensibilidad en bacterias ambientales al tratarse de un antibiótico de síntesis (Pérez y col., 2022). Si bien es verdad que la fluoroquinolona enrofloxacin se emplea ampliamente en veterinaria en España (Plan Nacional

Tabla V.1. Número de bacterias endocitobiontes (BE) resistentes a los antibióticos y familias de antibióticos evaluados.

ESTACIÓN	TOTAL BE	AMP	OX	CRO	AP	GM	H	K	ST	AZM	E	CIP	NAL	CL	MNO	RA	SXT
EM.1	20	10	19	5	4	1	19	8	14	13	18	2	3	3	2	0	1
EM.2	21	2	9	0	6	10	19	10	1	6	6	1	6	0	0	0	5
EM.3	2	2	2	0	0	0	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
EM.4	2	0	1	0	1	0	2	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0
EM.5	16	4	14	0	9	1	15	3	7	8	13	2	9	1	0	4	2
EM.6	14	4	10	0	2	2	14	1	3	7	5	0	4	0	1	0	2
EM.7	2	1	1	0	1	0	2	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
Total	77	23	56	5	23	14	73	24	27	36	45	6	26	6	4	6	10
Porcentaje		29,9	72,7	6,5	29,9	18,2	94,8	31,1	35,1	46,8	58,4	7,8	33,8	7,8	5,2	5,2	13,0
ESTACIÓN	TOTAL BE	BL			AG					MC		QN		AF	TT	RF	SXD
EM.1	20	20			20					18		3		3	2	0	1
EM.2	21	13			19					6		6		0	1	0	5
EM.3	2	2			2					1		1		1	1	1	0
EM.4	2	1			2					1		2		0	0	0	0
EM.5	16	14			16					13		9		1	3	4	2
EM.6	14	13			14					7		4		0	1	0	2
EM.7	2	2			2					1		1		1	0	1	0
Total	77	65			75					47		26		6	8	6	10
Porcentaje		84,4			97,4					61,0		33,8		7,8	10,4	7,8	13,0

AF: anfenicoles; AG: aminoglucósidos; AMP: ampicilina; AP: apramicina; AZM: azitromicina; BL: betalactámicos; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; EM: estación de muestreo; GM: gentamicina; H: higromicina B; K: kanamicina; MC: macrólidos; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidíxico; OX: oxacilina; QN: quinolonas; RA: rifampicina; RF: rifamicinas; ST: estreptomicina; SXD: combinación de sulfadiazina y diaminopirimidina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TT: tetraciclinas.

de Resistencia a Antibióticos, PRAN, 2023), parece no haberse diseminado la resistencia a la misma entre las BE evaluadas. Comparando con otros estudios, la resistencia a fluoroquinolonas parece ser más frecuente en zonas influenciadas por aguas residuales que en ríos (Marti y col., 2014; Servais y Passerat, 2009).

Comparando con otros estudios, resalta la baja tasa de resistencia a tetraciclinas, muy recurrente en ambientes acuáticos (Amato y col., 2021; Sidrach-Cardona y col., 2014) y esperable en la zona de estudio debido a la gran cantidad de tetraciclina empleada en el sector cunícola en España (PRAN, 2023). Es posible que los resultados se deban a haber evaluado la resistencia a minociclina, ya que se observa una menor proporción de resistencias a este antibiótico semisintético de segunda generación, en comparación con la tetraciclina. El hecho de haber aislado una alta tasa de bacterias gram positivas también puede influir, ya que el mecanismo de resistencia a tetraciclinas más comúnmente detectado, las proteínas de eflujo, es propio de bacterias gram negativas, mientras que en cocos gram positivos (como *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. y *Kocuria* spp.) este mecanismo no confiere resistencia a minociclina (Asadi y col., 2020).

Como se puede advertir, la resistencia a determinadas familias sólo se observa en algunos de los ríos evaluados, como es el caso de la resistencia a la asociación de sulfadiazina y diaminopirimidina (presente en EM.1, EM.2, EM.5 y EM.6), tetraciclinas (EM.1, EM.2, EM.3, EM.5 y EM.6), anfenicoles (EM.1, EM.5, EM.7) y rifamicinas (EM.3, EM.5 y EM.7). En todos los casos, la resistencia a estas familias se presenta en cepas multirresistentes. Otros estudios realizados en ríos también han reportado bajas tasas de resistencia a minociclina, sulfametoxazol-trimetoprim y cloranfenicol (Mohanta y Goel, 2014; Pérez y col., 2022; Servais y Passerat, 2009), así como la resistencia a minociclina y sulfametoxazol-trimetoprim ligada únicamente a perfiles de multirresistencia (Amato y col., 2021; Pérez y col., 2022). En estos casos, pueden estar interviniendo bombas de eflujo que producen resistencia simultánea a diferentes antibióticos. Este mecanismo, además, suele estar presente de manera sinérgica con otros (Fuentes y col., 2014), lo cual podría explicar estos perfiles de multirresistencia.

Bacterias multirresistentes

Considerando bacterias multirresistentes (MR) a aquellas que presentan resistencia a antibióticos de tres o más familias y, bacterias con multirresistencia extendida (MRX), a aquellas que presentan resistencia a antibióticos de cinco o más familias (Amato y col., 2021), se puede observar que el 74 % de las BE evaluadas (57 de 77) presentan un perfil de multirresistencia, de

las cuales, 11 presentan además multirresistencia extendida. Estos valores son algo inferiores al 88 % de cepas MR que obtuvieron Amato y col. (2021) en su estudio en aguas de río de Valencia, pero superiores al 37% y 39 % de bacterias MR (*E. coli* y aerobias totales, respectivamente) que obtuvieron Pérez y col. (2022) en el río Nervión. Dichos estudios se diferencian en el mayor y menor impacto de actividades humanas, respectivamente; y es que los perfiles de multirresistencia suelen encontrarse ligados a descargas de aguas residuales (Sidrach-Cardona y col., 2014).

El índice de multirresistencia a antibióticos (MRA) se emplea para identificar si las bacterias provienen de ambientes con alta ($MRA > 0,2$) o baja ($MRA < 0,2$) presión antibiótica (Apartado III.3.2.4). Los resultados relativos a este índice (Tabla V.2) indican que gran parte de las cepas provienen de ambientes con alta presión antibiótica, al presentar 56 de las cepas (73 %) un índice $MRA > 0,2$. Además, el índice MRA promedio, por estación de muestreo, es también superior a 0,2 en todas las aguas superficiales evaluadas, señalando la afectación de toda la zona estudiada; aunque hay que recordar que estos valores pertenecen a cepas previamente seleccionadas por sus perfiles de resistencia. Comparando con un estudio realizado en el río Sena en Francia, se obtuvieron valores promedios $MRA < 0,2$ en zonas con y sin contaminación agrícola dispersa e índices promedio $MRA > 0,2$ en efluentes de aguas residuales de hospitales; si bien es verdad que en dicho estudio sólo se estudiaron bacterias de origen fecal (Servais y Passerat, 2009).

Estos resultados, por tanto, sugieren que las bacterias MR extraídas de las AVL pueden provenir de las zonas ganaderas adyacentes, bien por escorrentía de las aguas de lluvia contaminadas o por infiltraciones en las aguas subterráneas y/o que las AVL influyan en la multirresistencia de las bacterias que portan en su interior.

De cara a evaluar el posible impacto de la presión ganadera de la zona de estudio, se llevó a cabo un estudio de mayor profundidad de la resistencia a aminoglucósidos ya que, antibióticos como la apramicina e higromicina son de uso exclusivo veterinario y, otros, como la espectinomicina, estreptomicina y gentamicina se usan tanto en animales como humanos.

Tabla V.2. Perfiles de resistencia de las bacterias endocitobiontes (BE) identificadas, índice de multirresistencia a antibióticos (MRA) y categorización como cepa con perfil de multirresistencia (MR) o multirresistencia extendida (MRX).

AVL	BE	PERFIL DE RESISTENCIAS					ÍNDICE MRA	MR/MRX
5512	<i>Bacillus altitudinis</i>	OX ^R	H ^R	E ^R CIP ^I			0,19	MR
1113	<i>Bacillus cereus</i>	AMP ^R OX ^R CRO ^R	H ^R	E ^R CIP ^I	CL ^R	SXT ^R	0,44	MRX
1113	<i>Bacillus clausii</i>	AMP ^R OX ^R CRO ^R	H ^R	ST ^R AZ ^R E ^R CIP ^I			0,44	MR
1113	<i>Bacillus clausii</i>	AMP ^R OX ^R CRO ^R	H ^R K ^R ST ^R	AZ ^R E ^R CIP ^I			0,50	MR
1113	<i>Bacillus clausii</i>	OX ^R	H ^R K ^R ST ^R	AZ ^R E ^R CIP ^I			0,38	MR
1113	<i>Bacillus clausii</i>	OX ^R	H ^R	ST ^R AZ ^R E ^R CIP ^I			0,31	MR
1113	<i>Bacillus clausii</i>	CRO ^R		ST ^R AZ ^R E ^R CIP ^I			0,25	MR
141	<i>Bacillus licheniformis</i>	AMP ^R OX ^R	AP ^R	H ^R	E ^R CIP ^I		0,31	MR
141	<i>Bacillus licheniformis</i>	OX ^R		H ^R ST ^R	E ^R CIP ^I		0,25	MR
141	<i>Bacillus licheniformis</i>	OX ^R		H ^R	E ^R CIP ^I		0,19	MR
142	<i>Bacillus licheniformis</i>	OX ^R	AP ^R	H ^R K ^R ST ^R	AZ ^R E ^R CIP ^R NAL ^R CL ^R MNO ^R		0,69	MRX
35	<i>Bacillus licheniformis</i>	AMP ^R OX ^R		H ^R	E ^I CIP ^I NAL ^R	SXT ^R	0,31	MR
5511	<i>Bacillus niabensis</i>	OX ^R		H ^R ST ^R AZ ^R E ^R CIP ^I			0,31	MR
5511 y 5521	<i>Bacillus pumilus</i>			H ^R	E ^R CIP ^I		0,13	-
1113	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	AMP ^R OX ^R		H ^R K ^R ST ^R AZ ^R E ^R CIP ^I	CL ^R MNO ^R		0,56	MRX
72	<i>Paenibacillus lautus</i>	OX ^R	AP ^R	H ^R	CIP ^R NAL ^R		0,31	MR
211	<i>Microbacterium arborescens</i> *	OX ^R	AP ^R	H ^R	CIP ^I NAL ^R	SXT ^R	0,29	MR
211	<i>Microbacterium arborescens</i> *	OX ^R	AP ^R	H ^R	CIP ^I	SXT ^R	0,24	MR
622	<i>Microbacterium arborescens</i>	OX ^R	AP ^R	H ^R K ^I	CIP ^I NAL ^R	SXT ^R	0,24	MR
1111	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	AMP ^R OX ^R	AP ^R GM ^R	H ^R K ^R ST ^R AZ ^R E ^R CIP ^I NAL ^R			0,59	MR
522	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	AMP ^R OX ^R	AP ^R	H ^R ST ^R AZ ^R E ^R CIP ^R NAL ^R CL ^R TET ^R RA ^R			0,71	MRX

AMP: ampicilina; AP: apramicina; ATM: aztreonam; AVL: amebas de vida libre; AZM: azitromicina; CAZ: ceftazidima; CC: clindamicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; GM: gentamicina; H: higromicina; IMI: imipenem; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidixico; OX: oxacilina; PEN: penicilina; PIP: piperacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina; TET: tetraciclina; *: *Microbacterium arborescens/imperiale*. El código de colores hace referencia a las familias de antibióticos. (Entre paréntesis se muestran las resistencias no contabilizadas en el cálculo del índice MRA).

Tabla V.2. Perfiles de resistencia de las bacterias endocitobiontes (BE) identificadas, índice de multirresistencia a antibióticos (MRA) y categorización como cepa con perfil de multirresistencia (MR) o multirresistencia extendida (MRX). *Continuación.*

AVL	BE	PERFIL DE RESISTENCIAS												ÍNDICE MRA	MR/MRX					
5511	Microbacterium paraoxydans	AMP ^R	OX ^R	AP ^R	GM ^R	H ^R	K ^R	ST ^R	AZ ^R	E ^R	CIP ^R	NAL ^R	TET ^R	RA ^R	0,76	MRX				
5511	Microbacterium paraoxydans		OX ^R	AP ^R		H ^R	K ^I	ST ^R		E ^R	CIP ^I	NAL ^R		RA ^R	SXT ^R	0,47	MRX			
5511	Microbacterium paraoxydans		OX ^R	AP ^R		H ^R			AZ ^R	E ^R	CIP ^I	NAL ^R	TET ^R	RA ^R		0,47	MRX			
5512	Microbacterium paraoxydans		OX ^R	AP ^R		H ^R	K ^I	ST ^R		E ^R	CIP ^I	NAL ^R				0,35	MR			
13	Staphylococcus epidermidis	AMP ^R	PEN ^R	OX ^R	FOX ^R			H ^R	K ^I		AZ ^R	E ^R	CIP ^I			0,35	MR			
2132	Staphylococcus epidermidis		PEN ^R	OX ^R	FOX ^R		GM ^R	H ^R			AZ ^R	E ^R	CIP ^I			0,35	MR			
231	Staphylococcus epidermidis	AMP ^R	PEN ^R	OX ^R	FOX ^R	AP ^R	GM ^I	H ^R			AZ ^R	E ^R	CIP ^I			0,40	MR			
521	Staphylococcus epidermidis	AMP ^R	PEN ^R	OX ^R	FOX ^R			H ^R			AZ ^R	E ^R	CIP ^I	NAL ^R		SXT ^R	0,45	MRX		
521	Staphylococcus epidermidis		PEN ^R	OX ^R	FOX ^R	AP ^R		H ^R	ST ^R	AZ ^R	E ^R	CIP ^I				0,40	MR			
643	Staphylococcus epidermidis	AMP ^R	PEN ^R	OX ^R	FOX ^R			H ^R			AZ ^R		CIP ^I		MNO ^R	SXT ^R	0,40	MRX		
643	Staphylococcus epidermidis	AMP ^R	PEN ^R	OX ^R	FOX ^R			H ^R			AZ ^R		CIP ^I				0,30	MR		
2132	Staphylococcus pasteurii		OX ^R					H ^R					CIP ^I	NAL ^R			0,15	MR		
2132	Staphylococcus pasteurii							H ^R			E ^I		CIP ^I	NAL ^R			0,10	-		
32	Staphylococcus pasteurii	AMP ^R	OX ^R					H ^R	K ^R	ST ^R	AZ ^R	E ^R	CIP ^I		CL ^R	MNO ^R	RA ^R	CC ^R	0,55	MRX
4412	Staphylococcus pasteurii		OX ^R			AP ^R		H ^R					CIP ^I	NAL ^R					0,20	MR
521	Staphylococcus pasteurii	AMP ^R	PEN ^R					H ^R			AZ ^R	E ^R	CIP ^I	NAL ^R					0,30	MR
62112	Staphylococcus pasteurii	AMP ^R	PEN ^R			AP ^R	GM ^R	H ^R	K ^R	ST ^R	AZ ^R	E ^R	CIP ^I						0,45	MR
62112	Staphylococcus pasteurii	AMP ^R	PEN ^R				GM ^I	H ^R		ST ^R	AZ ^R	E ^R	CIP ^I						0,30	MR
62112	Staphylococcus pasteurii		PEN ^R					H ^R			AZ ^R	E ^R	CIP ^I	NAL ^R					0,25	MR
62112	Staphylococcus pasteurii		OX ^R					H ^R			AZ ^R	E ^R	CIP ^I						0,20	MR
72	Staphylococcus pasteurii	AMP ^R						H ^R	K ^R	ST ^R		E ^R	CIP ^I		CL ^R		RA ^R		0,35	MRX

AMP: ampicilina; AP: apramicina; ATM: aztreonam; AVL: amebas de vida libre; AZM: azitromicina; CAZ: ceftazidima; CC: clindamicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; GM: gentamicina; H: higromicina; IMI: imipenem; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidixico; OX: oxacilina; PEN: penicilina; PIP: piperacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina; TET: tetraciclina; *: *Microbacterium arborescens/imperiale*. El código de colores hace referencia a las familias de antibióticos. (Entre paréntesis se muestran las resistencias no contabilizadas en el cálculo del índice MRA).

Tabla V.2. Perfiles de resistencia de las bacterias endocitobiontes (BE) identificadas, índice de multiresistencia a antibióticos (MRA) y categorización como cepa con perfil de multiresistencia (MR) o multiresistencia extendida (MRX). *Continuación.*

AVL	BE	PERFIL DE RESISTENCIAS				ÍNDICE MRA	MR/MRX
521 y 62112	<i>Staphylococcus equorum</i>	OX ^R	H ^R	CIP ^I NAL ^R		0,15	MR
62112	<i>Staphylococcus equorum</i>		GM ^R H ^R ST ^R	CIP ^I NAL ^R		0,20	-
142	<i>Staphylococcus warneri</i>	AMP ^R PEN ^R OX ^R	H ^R	CIP ^I		0,20	-
2121	<i>Staphylococcus warneri</i>	PEN ^R	GM ^R H ^R K ^R	AZ ^R E ^R CIP ^I	TET ^R	0,35	MR
2121	<i>Staphylococcus warneri</i>	PEN ^R	GM ^R H ^R K ^R	CIP ^I		0,20	-
2121	<i>Staphylococcus warneri</i>		GM ^R H ^R K ^R	CIP ^I		0,15	-
2121	<i>Staphylococcus warneri</i>		H ^R	AZ ^R E ^R CIP ^I		0,15	-
643	<i>Staphylococcus warneri</i>	PEN ^R OX ^R	H ^R	CIP ^I		0,15	-
643	<i>Staphylococcus warneri</i>	OX ^R	H ^R	CIP ^I		0,10	-
2132	<i>Kocuria rhizophila</i>	OX ^R		CIP ^R NAL ^R		0,19	-
521	<i>Kocuria rhizophila</i>	OX ^R AP ^R	ST ^R	CIP ^I		0,19	-
142	<i>Micrococcus luteus</i>	OX ^R AP ^R	H ^R K ^R ST ^R	CIP ^R NAL ^R		0,44	MR
4412	<i>Micrococcus luteus</i>		H ^R	AZ ^R E ^R CIP ^I NAL ^R		0,25	MR
522	<i>Micrococcus luteus</i>	OX ^R AP ^R	H ^R K ^R	AZ ^R E ^R CIP ^I NAL ^R		0,44	MR
522	<i>Micrococcus luteus</i>	OX ^R AP ^R	H ^R K ^R	CIP ^I NAL ^R		0,31	MR
2121	<i>Pseudoxanthomonas indica</i>	AMP ^R (OX ^R)	GM ^R H ^R K ^R ST ^R	CIP ^I		0,38	-
2132	<i>Pantoea agglomerans</i>	(OX ^R)	H ^R K ^R	AZ ^R E ^R CIP ^I NAL ^R		0,38	MR
2132	<i>Pseudomonas koreensis</i>	PIP ^I FEP ^R CAZ ^I ATM ^R IMI ^I	(AZ ^R E ^R)	CIP ^I		0,25	-

AMP: ampicilina; AP: apramicina; ATM: aztreonam; AVL: amebas de vida libre; AZM: azitromicina; CAZ: ceftazidima; CC: clindamicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; FEP: cefepima; FOX: ceftoxitina; GM: gentamicina; H: higromicina; IMI: imipenem; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidixico; OX: oxacilina; PEN: penicilina; PIP: piperacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina; TET: tetraciclina; *: *Microbacterium arborescens/imperiale*. El código de colores hace referencia a las familias de antibióticos. (Entre paréntesis se muestran las resistencias no contabilizadas en el cálculo del índice MRA).

1.2. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A AMINOGLUCÓSIDOS

Tras evaluar el perfil de resistencias de la selección de bacterias endocitobiontes (BE), y con el objeto de profundizar en la familia de aminoglucósidos, se evaluó la sensibilidad a esta familia de antibióticos en una selección que agrupa a las 57 cepas con los fenotipos de resistencia a aminoglucósidos de mayor interés. Esta selección incluye BE de las EM.1-EM.7. Para ello, en primer lugar, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de las BE para los antibióticos apramicina, higromicina, gentamicina y estreptomcina, antibióticos empleados en ganadería (Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos, PRAN, 2023). En segundo lugar, y con el objeto de inferir los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos subyacentes, se realizan antibiogramas disco-placa para 13 aminoglucósidos adicionales a esta misma selección de BE.

1.2.1. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

La determinación de las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de las BE seleccionadas, se realizó siguiendo la metodología descrita en el Apartado III.3.2.2. Los resultados se muestran en la Tabla V.3. Algunas de las cepas no pudieron ser evaluadas debido a que no se consiguió su crecimiento adecuado para este estudio.

Los aminoglucósidos son antibióticos de amplio espectro que tienen un efecto bactericida dependiente de su concentración (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Además, presentan efecto postantibiotico, lo que indica que la inhibición persiste tras la exposición al antimicrobiano (Sociedad Española de Quimioterapia, 2006). Normalmente, en antibióticos considerados bactericidas, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) tienen valores próximos, que difieren en una o dos diluciones. En ocasiones se observan fenómenos de tolerancia, cuando los valores de CMI y CMB están separados por al menos 5 diluciones dobles (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC, 2000b). En el presente trabajo, se puede observar que la mayoría de las cepas evaluadas presentan valores que distan hasta 2 diluciones dobles, indicando el carácter bacteriostático de los antibióticos evaluados (Tabla V.3).

Los valores de CMI obtenidos varían dependiendo del antibiótico: desde 2 a 512 $\mu\text{g/mL}$ para la apramicina, de 4 a $>1024 \mu\text{g/mL}$ para higromicina, de 0,5 a $>256 \mu\text{g/mL}$ para gentamicina y de 0,5 a $>256 \mu\text{g/mL}$ para estreptomcina. Los valores de CMB fueron iguales o superiores a los valores de CMI para todas las cepas estudiadas y, en el caso de la apramicina e higromicina, se

elevaron de 2 a 1024 µg/mL y de 8 a >1024 µg/mL, respectivamente. Se pueden observar diferencias por género y especies; sin embargo, se ha de tener en cuenta que los puntos de corte para la clasificación de las cepas como resistentes o sensibles varía entre especies y antibióticos. Dado que en la mayoría de los casos evaluados no existen criterios establecidos para realizar esta categorización, se correlacionan los resultados obtenidos mediante las metodologías del antibiograma y la CMI para clasificar las cepas como S/R.

En el caso de la gentamicina, según la guía del Comité Europeo de Estudio de la Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST, 2024), una CMI (GM) ≥ 4 µg/mL indica resistencia a este antibiótico para *Staphylococcus* y *Enterobacterales* (aplicable para *Pantoea agglomerans*), mientras que, según las guías del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2015, 2020), son necesarios valores de CMI (GM) ≥ 16 µg/mL para identificar como resistentes a *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacterales*; aunque Agerso y col. (2018) propuso una CMI (GM) ≥ 8 µg/mL como punto de corte para *Bacillus*. Pese a la disparidad de criterios, los perfiles de resistencia obtenidos mediante antibiograma de todas las cepas de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Micrococcus luteus* y *Kokuria rhizophila* coinciden con los fenotipos obtenidos por CMI, ya que todos los aislamientos son sensibles a este antibiótico y presentan CMI (GM) ≤ 4 µg/mL. Igualmente, *P. agglomerans* y *Pseudomonas koreensis* también resultaron sensibles mediante antibiograma y muestran valores de CMI inferiores a los puntos de corte indicados. En el caso de *Microbacterium*, se obtuvieron CMI (GM) = 8 µg/mL en cepas que en algunos casos se muestran sensibles según el antibiograma y, en otros, resistentes. Es posible que esto se deba al margen de error inherente a la técnica de microdilución, estimado en una dilución doble (SEIMC, 2000b), o a la variabilidad en la composición de los diferentes formatos comerciales de gentamicina (en polvo, empleado para la determinación de los valores de CMI y CMB, y en disco, utilizado para los antibiogramas). Estos formatos pueden contener distintas proporciones de sus componentes principales, gentamicina C₁, C_{1A} y C₂ (Chemotechnique Diagnostics, 2017).

Llama la atención la cepa *Pseudoxanthomonas indica* 2121.22, aislada a partir de medio MH con gentamicina y resistente a este antibiótico según el antibiograma, pero con una CMI (GM) = 2 µg/mL. Dado que este género no ha sido muy estudiado en cuanto a su resistencia a antibióticos, se mantiene la consideración como cepa resistente y se espera que esta información pueda servir de utilidad como referencia para futuras ocasiones. En el caso de *Staphylococcus* spp., atendiendo a los valores de CMI obtenidos, se observa que hay varias cepas cuya resistencia a este antibiótico ha sido subestimada mediante la técnica del antibiograma (*S. warneri* 2121.10, 2121.20, 2121.21 y *S. epidermidis* 2132.3) y, por tanto, han de considerarse resistentes a

gentamicina. En el caso de *S. pasteurii* 4412.1, teniendo en cuenta el error de la técnica, el halo de inhibición obtenido (Anexo I) y que presenta una CMI = 4 µg/mL, se considera que se trata de una cepa sensible. Destacan las cepas *S. warneri* de la AVL 2121 y la cepa *S. pasteurii* 62112.1 por ser las que presentan mayores valores de CMI frente a este antibiótico (CMI ≥ 128 µg/mL).

Respecto a estreptomicina, una CMI (ST) ≥ 64 µg/mL indica resistencia en *E. coli* (Exopol, 2022), una CMI (ST) ≥ 32 µg/mL indica resistencia en *Staphylococcus* spp. (Shin y col., 2019) y una CMI (ST) ≥ 16 µg/mL indica resistencia en *Bacillus* spp. (Agero y col., 2018). Extrapolando estos valores a bacterias gram negativas (*Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* y *Pantoea*), cocos gram positivos (*Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*) y bacilos gram positivos (*Bacillus*, *Paenibacillus* y *Microbacterium*), respectivamente, se observa que el fenotipo obtenido mediante CMI y antibiograma de todas las cepas de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *M. luteus* y las gram negativas coinciden. En el caso de *Microbacterium* spp. y *Staphylococcus* spp., algunas cepas podrían reconsiderarse sensibles/resistentes debido a que sus valores de CMI se sitúan en torno al punto de corte (16 y 32 µg/mL), pero teniendo en cuenta que la técnica tiene un error de una dilución, se mantiene la interpretación obtenida a partir el halo de inhibición. La cepa *S. equorum* 62112.8 muestra un fenotipo de resistencia dado el valor de la CMI obtenido (128 µg/mL), el cual, parece haber sido subestimado por la técnica del antibiograma, por lo que se la reconsidera como resistente (Tabla V.2). En el caso de la cepa *K. rhizophila* 521.6, se observa un perfil ST^R según el antibiograma y una CMI (ST) = 0,5 µg/mL que replantearía considerar la cepa como sensible a este antibiótico; sin embargo, es posible que este resultado se deba a que la morfología de las colonias es rugosa, abultada, seca y granular, lo que dificulta la formación de suspensiones homogéneas al preparar el inóculo de la misma. Las cepas con mayores CMI para este antibiótico resultaron ser las cepas *Bacillus calusii* y *Paenibacillus glucanolyticus* de la AVL 1113 y las cepas *S. pasteurii* 32.4, 62112.1 y 72.7 con valores de CMI ≥ 128 µg/mL.

En el caso de apramicina, según la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencia a Antibióticos (2005), se requieren valores de CMI (AP) ≥ 32 µg/mL para considerar resistentes a las bacterias gram negativas. Este mismo punto de corte ha sido considerado al analizar la resistencia a apramicina en estudios de *Staphylococcus aureus* (Fessler y col., 2011), por lo que se extrapola a las bacterias gram positivas de este estudio. Atendiendo a los resultados, la categorización como resistente/sensible de las cepas de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *M. luteus*, *K. rhizophila* y *P. agglomerans* mediante antibiograma coincide con la otorgada mediante la determinación de la CMI tomando el valor de CMI (AP) ≥ 32 µg/mL como punto de corte. En el caso de *Staphylococcus* y *P. indica*, se observan algunas cepas que poseen CMI = 16 µg/mL y muestran un fenotipo resistente mediante el antibiograma, y otras que poseen CMI = 32 µg/mL

y muestran un fenotipo sensible, lo cual podría achacarse al error propio de la técnica de la microdilución. Teniendo en cuenta estos resultados, podría extrapolarse el valor CMI (AP) ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ como punto de corte para asignar resistencia apramicina en bacterias gram positivas. Destacan las cepas *Microbacterium paraoxydans* 5511.11, *M. arborescens* (incluidas las cepas de *M. arborescens/imperiale*) y *S. pasteurii* 62112.1 por presentar los mayores valores de CMI (CMI ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$).

La higromicina es un antibiótico complejo de evaluar ya que apenas hay información en la bibliografía respecto a valores de CMI, además, la mayoría de las cepas se mostraron resistentes según el antibiograma, pero se obtuvieron valores de CMI muy dispares. McGaha y Champney (2007) establecieron que una CMI ≥ 150 $\mu\text{g/mL}$ para higromicina indicaba resistencia en *E. coli*. El fenotipo de resistencia a higromicina determinado mediante antibiograma y CMI de las bacterias gram negativas evaluadas coincidiría y corroboraría este punto de corte. Sin embargo, no se ha encontrado en la bibliografía ninguna referencia respecto a bacterias gram positivas. Atendiendo a los resultados obtenidos, parece que los valores de CMI de corte para determinar resistencia a este antibiótico podrían ser CMI (H) ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de *Staphylococcus* spp., *Microbacterium* spp. y *K. rhizophila*, y entre 8 $\mu\text{g/mL}$ y 16 $\mu\text{g/mL}$ para *Bacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. (teniendo en cuenta el error de la técnica); aunque sería necesario estimar estos puntos de corte mediante un método normalizado de interpretación de resistencia (Costa y col., 2021). En el caso de *M. luteus*, todas las cepas evaluadas resultaron resistentes según el antibiograma y mostraron CMI (H) = 128 $\mu\text{g/mL}$, por lo que no pueden establecerse valores de puntos de corte de sensibilidad/resistencia. Igualmente, este valor puede servir como referencia para futuros estudios. Las cepas con mayores valores de CMI para este antibiótico son las cepas de *S. warneri* y *P. indica* de la AVL 2121, *S. epidermidis* 2132.3, *S. pasteurii* 62112.1 y *S. equorum* 62112.8, con valores de CMI ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla V.3. Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) en µg/mL, determinados para las bacterias endocitobiontes (BE) evaluadas (n = 51).

AVL	BE	IDENTIFICACIÓN	RESISTENCIA ANTIBIOGRAMA	APRAMICINA		HIGROMICINA		GENTAMICINA		ESTREPTOMICINA	
				CMI	CBI	CMI	CBI	CMI	CBI	CMI	CBI
1111	34	<i>M. paraoxydans</i>	AP GM H ST	128	512	64	128	8	16	32	128
1113	7	<i>B. clausii</i>	H ST	4	16	16	32	1	2	128	>256
1113	9 ^{AMP}	<i>B. clausii</i>	H ST	2	2	4	8	0,5	0,5	64	256
1113	10	<i>B. clausii</i>	ST	2	32	16	32	0,5	4	64	>256
1113	11	<i>B. clausii</i>	H ST	2	2	4	8	0,5	0,5	64	>256
1113	12	<i>B. clausii</i>	H ST	4	16	32	32	0,5	2	128	>256
1113	13 ^{AMP}	<i>B. clausii</i>	H ST	4	64	32	64	0,5	2	128	>256
1113	16	<i>B. clausii</i>	H ST	2	32	32	64	0,5	1	128	>256
1113	17 ^{AMP}	<i>P. glucanolyticus</i>	H ST	2	4	256	1024	2	8	256	>256
141	1	<i>B. licheniformis</i>	H ST	32	64	512	1024	4	4	128	>256
142	1 ^{AP}	<i>M. luteus</i>	AP H ST	64	64	128	256	2	4	64	64
142	2	<i>B. licheniformis</i>	AP H ST	32	64	512	512	4	4	128	>256
211	1 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	64	256	256	1024	4	8	8	16
211	2 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	64	256	128	512	4	16	8	16
211	3 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	128	512	256	1024	4	8	16	32
211	4 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	128	512	256	1024	4	8	8	16
211	5 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	128	512	256	512	4	8	8	16
2121	2	<i>S. warneri</i>	GM H	32	64	1024	>1024	128	128	16	32
2121	3	<i>S. warneri</i>	GM H	16	16	1024	>1024	>256	>256	32	32
2121	5 ^{GM}	<i>S. warneri</i>	GM H	8	32	1024	>1024	64	128	8	32
2121	10	<i>S. warneri</i>	GM H	32	32	1024	1024	256	256	32	32
2121	20	<i>S. warneri</i>	GM H	32	32	1024	>1024	128	128	32	32

AP: apramicina; AVL: ameba de vida libre; GM: gentamicina; H: higromicina; ST: estreptomicina. ^{AMP}: aislada en MH-Ampicilina; ^{AP}: aislada en MH-AP; ^{GM}: aislada en MH-GM; Se muestran en **rojo** las resistencias revaloradas mediante esta metodología.

Tabla V.3. Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) en µg/mL, determinadas para las bacterias endocitobiontes (BE) evaluadas (n = 51). *Continuación.*

AVL	BE	IDENTIFICACIÓN	RESISTENCIA ANTIBIOGRAMA	APRAMICINA		HiGROMICINA		GENTAMICINA		ESTREPTOMICINA	
				CMI	CBI	CMI	CBI	CMI	CBI	CMI	CBI
2121	21	<i>S. warneri</i>	GM H	8	16	1024	>1024	256	256	16	32
2121	22 ^{GM}	<i>P. indica</i>	GM H ST	32	32	>1024	>1024	2	2	64	64
2132	2 ^{AMP}	<i>P. koreensis</i>	H	2	2	8	32	0,5	0,5	1	2
2132	3 ^{AMP}	<i>S. epidermidis</i>	GM H	16	16	1024	>1024	16	16	16	64
2132	5	<i>S. pasteuri</i>	H	4	4	128	256	0,5	0,5	8	8
2132	7 ^{AP}	<i>P. agglomerans</i>	AP H	32	64	256	256	2	2	8	16
231	1	<i>S. epidermidis</i>	AP H	16	32	128	1024	1	4	8	16
32	4 ^{AMP}	<i>S. pasteuri</i>	H ST	2	2	256	1024	2	4	>256	>256
4412	1 ^{AP}	<i>M. luteus</i>	AP H	128	128	128	256	4	4	32	32
521	2	<i>S. equorum</i>	H	2	2	32	64	0,5	0,5	1	2
521	3 ^{AP}	<i>S. epidermidis</i>	AP H ST	32	64	128	1024	1	4	16	32
521	6	<i>K. rhizophila</i>	AP ST	64	64	32	32	0,5	0,5	0,5	0,5
521	7 ^{AMP}	<i>S. epidermidis</i>	H	16	16	128	256	2	2	8	16
521	9 ^{AMP}	<i>S. pasteuri</i>	H	8	8	512	1024	1	1	8	32
522	10 ^{AP}	<i>M. luteus</i>	AP H	128	128	128	256	2	2	16	16
522	12	<i>M. luteus</i>	AP H	256	256	128	256	4	8	8	16
522	22	<i>M. paraoxydans</i>	AP H ST	128	512	128	256	8	32	32	256
5511	7 ^{AP}	<i>M. paraoxydans</i>	AP H	128	256	32	64	4	8	32	256
5511	9	<i>M. paraoxydans</i>	AP H ST	128	256	128	512	8	16	32	128
5511	11	<i>M. paraoxydans</i>	AP GM H ST	512	1024	64	128	16	64	64	>256
5512	1 ^{AP}	<i>M. paraoxydans</i>	AP H ST	64	256	32	64	4	8	32	256

AP: apramicina; AVL: ameba de vida libre; GM: gentamicina; H: higromicina; ST: estreptomicina. ^{AMP}: aislada en MH-Ampicilina; ^{AP}: aislada en MH-AP; ^{GM}: aislada en MH-GM; Se muestran en **rojo** las resistencias revaloradas mediante esta metodología.

Tabla V.3. Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) en µg/mL, determinadas para las bacterias endocitobiontes (BE) evaluadas (n = 51). *Continuación.*

AVL	BE	IDENTIFICACIÓN	RESISTENCIA ANTIBIOGRAMA	APRAMICINA		HIGROMICINA		GENTAMICINA		ESTREPTOMICINA	
				CMI	CBI	CMI	CBI	CMI	CBI	CMI	CBI
62112	1 ^{AMP}	<i>S. pasteurii</i>	AP GM H ST	512	1024	>1024	>1024	128	128	>256	>256
62112	2	<i>S. pasteurii</i>	H	4	8	128	512	0,5	1	4	32
62112	5	<i>S. pasteurii</i>	H ST	16	32	128	512	0,5	2	32	64
62112	8	<i>S. equorum</i>	GM H ST	32	32	>1024	>1024	8	16	128	256
62112	9	<i>S. equorum</i>	H	4	4	32	128	0,5	0,5	1	1
622	1	<i>M. arborescens</i>	AP H	256	1024	128	256	4	8	8	16
72	7 ^{AMP}	<i>S. pasteurii</i>	H ST	4	8	256	>1024	2	32	256	>256
72	11 ^{AP}	<i>P. lautus</i>	AP H	32	64	16	64	1	1	2	4

AP: apramicina; AVL: ameba de vida libre; GM: gentamicina; H: higromicina; ST: estreptomicina. ^{AMP}: aislada en MH-Ampicilina; ^{AP}: aislada en MH-AP; ^{GM}: aislada en MH-GM; Se muestran en **rojo** las resistencias revaloradas mediante esta metodología.

1.2.2. Perfil de resistencia a aminoglucósidos y posibles mecanismos de resistencia

Para estudiar en mayor profundidad los perfiles de resistencia a los antibióticos aminoglucósidos de la selección de cepas de BE, se evalúa su sensibilidad a un panel de antibióticos de esta familia, tal y como describe la metodología del Apartado III.3.2.1. En la Tabla V.4 se recogen los halos (mm) obtenidos. Algunas de las cepas no pudieron ser evaluadas debido a que no se consiguió su crecimiento adecuado para este estudio.

Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos que se unen al sitio A del ARN ribosómico (ARNr) 16 S, que conforma la subunidad 30 S del ribosoma, el cual reconoce los aminoacil-ARN de transferencia (ARNt), inhibiendo la síntesis de proteínas y provocando consecuentemente la muerte de la bacteria. La resistencia a estos antibióticos puede deberse a diferentes mecanismos: (1) la modificación enzimática e inactivación de los aminoglucósidos, (2) la disminución de su concentración en el interior de la célula, bien por disminuir la permeabilidad de la membrana o por transporte activo mediado por bombas de eflujo y (3) por modificaciones en la diana que interfieren con la unión de los aminoglucósidos (Shaw y col., 1993). En este último caso se han detectado tanto mutaciones en el propio ARNr 16 S en *Mycobacterium tuberculosis*, como metilaciones mediadas por ARNr metiltransferasas (Doi y col., 2016).

El mecanismo de resistencia más común a aminoglucósidos se debe a la inactivación enzimática mediante enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA), que pueden ser de tres tipos: acetiltransferasas (AAC), nucleotidiltransferasas o adenililtransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH). Estas suelen adquirirse mediante genes presentes en plásmidos y/o asociados a transposones, que ayudan a la rápida diseminación de resistencias entre especies. Estas enzimas se codifican en función del tipo de modificación enzimática (AAC, ANT, APH), el sitio de modificación (1, 3, 6, 9, 2', 3', 4', 6', 2'', 3''), los perfiles de resistencia que otorgan (I, II, III, IV, V, etc.) y la estructura de la proteína (a, b, c, etc.); de tal forma que, las enzimas AAC(6')-Ia y la AAC(6')-Ib son dos proteínas únicas que confieren perfil de resistencia idénticos. La nomenclatura de los genes que codifican estas enzimas: *aac(6')-Ia* y *aac(6')-Ib* son genes únicos que codifican dos proteínas con el mismo perfil de resistencia (Shaw y col., 1993).

Atendiendo al perfil de resistencias a aminoglucósidos de las bacterias evaluadas (Tabla V.4), se puede inferir la o las EMA que expresan, tal y como se desarrolla a continuación. No obstante, para definir de forma concreta el mecanismo de resistencia subyacente, debería comprobarse la presencia o ausencia de los genes codificantes mediante técnicas moleculares y/o de secuenciación, lo cual, sería de gran interés para realizar en futuros estudios.

Como se observa en los resultados, la resistencia a higromicina es la más prevalente en las BE evaluadas: el 95 % de las BE seleccionadas para el estudio de aminoglucósidos muestran resistencia a higromicina, de las cuales, 35 bacterias muestran además CMI $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ (Tabla V.3). La resistencia a este antibiótico se ha visto ligada a la expresión de la fosfotransferasa APH(4)-Ia en *Escherichia coli* (bacteria gram negativa) y a la APH(7'')-Ia en *Streptomyces hygroscopicus* (bacteria gram positiva capaz de sintetizar la higromicina B), enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a un grupo hidroxilo del antibiótico. Los genes que codifican estas enzimas, *hphB* e *hyg* respectivamente, se han encontrado codificados en plásmidos de bacterias de origen animal y humano (Gómez-Lus, 1998; Shaw y col., 1993), y podrían ser los responsables de la resistencia en las bacterias gram negativas y gram positivas del presente estudio, respectivamente.

La segunda resistencia más prevalente entre los aminoglucósidos evaluados es la resistencia a espectinomicina, presente en 49 (89 %) de las bacterias estudiadas. Se ha demostrado que la enzima APH(9) en *Legionella pneumophila* (bacteria gram negativa) confiere resistencia a espectinomicina, así como la ANT(9)-I lo hace en varias especies de *Enterococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. (bacterias gram positivas), codificada por los genes *ant(9)-I* en plásmido y trasposón (Ramírez y col., 2010; Ramírez y Tolmasky, 2010; Shaw y col., 1993; Zarate y col., 2018). La enzima ANT(3'')-I es capaz de adenilar e inactivar tanto espectinomicina como estreptomicina en bacterias gram negativas y gram positivas (Shaw y col., 1993; Woodford, 2005; Zarate y col., 2018), por lo que es posible que las 19 bacterias SPC^R que también son ST^R sean portadoras del gen que codifica esta enzima (*aadA*), el cual puede transferirse tanto por plásmidos como por transposones o integrones (Ramírez y col., 2010). En cuanto a la estreptomicina, un total de 26 BE muestran resistencia, de las cuales 11 presentan CMI $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ (Tabla V.3). De estas 26, 19 bacterias muestran el perfil SPC^R ST^R citado y, otras 7, muestran resistencia a estreptomicina y sensibilidad a espectinomicina. Esta resistencia se ha visto mediada por las enzimas ANT(6)-I en *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. y en *Enterococcus faecalis* mediante codificación plásmidica y cromosómica, por APH(3'')-I en *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus*, APH(3'')-II en *E. faecalis*, y por la enzima APH(6'')-I en *Streptomyces griseus* (Ramírez y Tolmasky, 2010; Shaw y col., 1993; Woodford, 2005; Zarate y col., 2018).

Tabla V.4. Halos (mm) de las bacterias endocitobiontes (BE) a los aminoglucósidos evaluados (n = 55).

CÓDIGO	BE	RESISTENTE A	AK	DK	GM _B	GM _{C1}	GM _{C2}	GM _{C1A}	K _A	K _B	2'NET	NM	PM	SIS	SPC
1111.34	<i>M. paraoxydans</i>	AP GM H K ST	8	12	8	19	14	7	10	12	0	35	17	9	6
1113.7	<i>B. clausii</i>	H ST	36	36	28	34	36	0	17	18	36	40	28	34	19
1113.8 ^{AMP}	<i>B. cereus</i>	H	22	21	21	21	23	-	20	21	13	23	16	22	9
1113.9 ^{AMP}	<i>B. clausii</i>	H ST	40	40	42	50	44	44	30	29	38	45	46	42	30
1113.10	<i>B. clausii</i>	ST	40	42	38	38	42	42	30	24	36	46	40	44	25
1113.11	<i>B. clausii</i>	H ST	40	43	32	42	44	42	28	28	44	42	37	42	25
1113.12	<i>B. clausii</i>	H K ST	32	32	24	30	34	33	16	15	28	33	25	30	18
1113.13 ^{AMP}	<i>B. clausii</i>	H K ST	33	33	22	30	30	36	15	15	36	36	24	30	17
1113.16	<i>B. clausii</i>	H K ST	34	34	26	22	30	40	13	11	32	36	25	30	0
1113.17 ^{AMP}	<i>P. glucanolyticus</i>	H K ST	19	12	17	25	35	28	0	10	12	41	28	26	0
13.1 ^{AMP}	<i>S. epidermidis</i>	H	24	28	28	29	29	-	26	28	27	32	28	30	0
141.1	<i>B. licheniformis</i>	H ST	29	34	33	35	36	40	30	30	32	30	27	34	8
142.1 ^{AP}	<i>M. luteus</i>	AP H K ST	15	12	18	16	17	16	14	16	8	23	10	16	10
142.8	<i>S. warneri</i>	H	22	28	27	28	31	-	24	28	21	28	21	24	0
211.1 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	23	14	30	35	29	26	15	20	0	34	17	21	0
211.2 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	23	14	28	23	27	23	14	20	0	33	12	21	0
211.3 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	23	12	27	24	30	27	15	21	0	35	18	22	0
211.4 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	23	12	29	25	32	26	15	20	0	37	18	22	0
211.5 ^{AP}	<i>M. arborescens/imperiale</i>	AP H	21	15	27	21	28	26	14	21	0	36	18	23	0
2121.2	<i>S. warneri</i>	GM H K	29	20	0	16	20	21	0	6	20	30	0	30	7
2121.3	<i>S. warneri</i>	GM H K	30	25	8	14	23	22	0	0	20	30	0	33	8
2121.5 ^{GM}	<i>S. warneri</i>	GM H K	24	14	0	10	11	10	0	15	0	36	26	19	0
2121.7 ^{GM}	ni	AP GM H K ST	0	0	0	18	10	0	0	8	0	31	11	0	0

AK: amikacina; AP: apramicina; DK: dibekacina; GM: gentamicina; H: higromicina; K: kanamicina; 2'NET: 2'-etil netilmicina; ne: no evaluado; ni: BE no identificada; NM: neomicina; PM: paromomicina; SIS: sisomicina; SPC: espectinomicina; ST: estreptomina. ^{AMP}: aislada en MH-Ampicilina; ^{AP}: aislada en MH-AP; ^{GM}: aislada en MH-GM. Se muestran en rojo las resistencias revaloradas mediante esta metodología.

Tabla V.4. Halos (mm) de las bacterias endocitobiontes (BE) a los aminoglucósidos evaluados (n = 55). *Continuación.*

CÓDIGO	BE	RESISTENTE A	AK	DK	GM _B	GM _{C1}	GM _{C2}	GM _{C1A}	K _A	K _B	2'NET	NM	PM	SIS	SPC
2121.10	<i>S. warneri</i>	GM H K	26	0	9	17	20	20	0	0	16	25	0	29	0
2121.20	<i>S. warneri</i>	GM H K	30	20	12	18	24	27	0	6	18	26	6	29	9
2121.21	<i>S. warneri</i>	GM H K	28	26	11	15	23	23	0	0	18	30	0	29	0
2121.22 ^{GM}	<i>P. indica</i>	GM H K ST	0	0	0	17	10	0	8	9	0	30	15	8	0
2132.2 ^{AMP}	<i>P. koreensis</i>	H	27	25	26	24	26	21	28	24	20	26	21	24	0
2132.5	<i>S. pasteurii</i>	H	24	28	28	30	30	28	25	28	28	30	24	27	0
2132.7 ^{AP}	<i>P. agglomerans</i>	AP H	17	21	22	25	23	21	20	20	23	27	17	22	0
231.1	<i>S. epidermidis</i>	AP H	18	10	20	18	23	20	15	20	0	25	10	16	0
32.4 ^{AMP}	<i>S. pasteurii</i>	H K ST	17	13	15	29	34	23	12	0	12	42	25	33	0
4412.1 ^{AP}	<i>M. luteus</i>	AP H	24	20	38	26	30	36	19	32	15	39	18	30	15
521.2	<i>S. equorum</i>	H	30	29	30	30	33	35	26	31	13	45	25	29	11
521.3	<i>S. equorum</i>	AP H ST	30	25	35	31	32	36	24	33	13	40	24	26	11
521.6	<i>K. rhizophila</i>	AP ST	32	28	38	32	37	34	28	32	14	40	24	28	0
521.7 ^{AMP}	<i>S. epidermidis</i>	H	32	28	38	32	37	34	28	32	14	40	24	28	0
521.9 ^{AMP}	<i>S. pasteurii</i>	H	24	24	24	20	24	24	21	24	23	25	22	23	0
522.10 ^{AP}	<i>M. luteus</i>	AP H	25	18	30	24	30	28	21	25	7	32	9	20	9
522.12	<i>M. luteus</i>	AP H	21	8	25	21	23	23	13	20	0	28	0	15	12
522.22	<i>M. paraoxydans</i>	AP H ST	21	12	23	16	21	21	15	22	0	34	14	20	0
5511.7 ^{AP}	<i>M. paraoxydans</i>	AP H	23	26	26	19	24	22	21	26	0	36	15	21	8
5511.9	<i>M. paraoxydans</i>	AP H ST	13	8	19	10	18	20	10	16	0	35	0	14	0
5511.10	<i>B. niabensis</i>	H ST	27	25	26	35	26	ne	27	27	24	25	22	21	8
5511.11	<i>M. paraoxydans</i>	AP GM H K ST	0	0	7	11	11	8	0	9	0	28	0	0	0

AK: amikacina; AP: apramicina; DK: dibekacina; GM: gentamicina; H: higromicina; K: kanamicina; 2'NET: 2'-etil netilmicina; ne: no evaluado; ni: BE no identificada; NM: neomicina; PM: paromomicina; SIS: sisomicina; SPC: espectinomicina; ST: estreptomicina. ^{AMP}: aislada en MH-Ampicilina; ^{AP}: aislada en MH-AP; ^{GM}: aislada en MH-GM. Se muestran en **rojo** las resistencias revaloradas mediante esta metodología.

Tabla V.4. Halos (mm) de las bacterias endocitobiontes (BE) a los aminoglucósidos evaluados (n = 55). *Continuación.*

CÓDIGO	BE	RESISTENTE A	AK	DK	GM _B	GM _{C1}	GM _{C2}	GM _{C1A}	K _A	K _B	2'NET	NM	PM	SIS	SPC
5512.1 ^{AP}	<i>M. paraoxydans</i>	AP H ST	14	7	19	10	18	18	0	16	0	34	0	15	0
62112.1 ^{AMP}	<i>S. pasteurii</i>	AP GM H ST	24	26	23	22	26	25	23	25	24	24	24	24	0
62112.2	<i>S. parteusi</i>	H	21	23	25	26	27	24	20	22	21	25	21	23	0
62112.5	<i>S. pasteurii</i>	H ST	22	24	22	25	26	25	22	26	23	28	20	21	8
62112.8	<i>S. equorum</i>	GM H ST	30	28	34	36	32	35	32	36	34	33	-	30	0
62112.9	<i>S. equorum</i>	H	24	24	24	20	24	24	21	24	23	25	22	23	0
622.1	<i>M. arborescens</i>	AP H	21	0	24	25	27	21	12	17	0	26	14	20	0
643.1 ^{AMP}	<i>S. epidermidis</i>	H	22	26	25	32	27	25	24	24	26	27	20	25	0
72.7 ^{AMP}	<i>S. pasteurii</i>	H K ST	19	15	15	28	30	29	10	13	12	39	26	32	0
72.11 ^{AP}	<i>P. lautus</i>	AP H	40	30	38	32	36	44	30	30	23	34	25	34	12

AK: amikacina; AP: apramicina; DK: dibekacina; GM: gentamicina; H: higromicina; K: kanamicina; 2'NET: 2'-etil netilmicina; ne: no evaluado; ni: BE no identificada; NM: neomicina; PM: paromomicina; SIS: sisomicina; SPC: espectinomomicina; ST: estreptomomicina. ^{AMP}: aislada en MH-Ampicilina; ^{AP}: aislada en MH-AP; ^{GM}: aislada en MH-GM. Se muestran en **rojo** las resistencias revaloradas mediante esta metodología.

Respecto a la apramicina, 23 (40 %) de las bacterias muestran resistencia a este antibiótico y 13 de ellas muestran una CMI ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla V.3). La enzima AAC(3)-IV es la EMA capaz de modificar apramicina que se ha encontrado con mayor frecuencia. Esta enzima confiere resistencia cruzada con gentamicina, tobramicina, dibekacina, sisomicina y, en menor medida, con 2'-etil netilmicina, y se ha detectado solamente en bacterias gram negativas (Plattner y col., 2020; Shaw y col., 1993). La única bacteria gram negativa AP^R en el presente estudio es *Pantoea agglomerans* 2132.7 y, atendiendo a su perfil (Tabla V.4), esta resistencia podría estar ocasionada por la enzima AAC(1), capaz de acetilar e inactivar apramicina y paromomicina, detectada en plásmidos de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Campylobacter* (Shaw y col., 1995; Zarate y col., 2018). En el caso de bacterias gram positivas, menos estudiadas en cuanto a la resistencia a apramicina, se ha detectado el gen *apmA*, que codifica una N-acetiltransferasa capaz de otorgar resistencia a este antibiótico. Esta enzima se describió por primera vez en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de ganado porcino y bovino, codificada en plásmidos que otorgaban multiresistencia (Fessler y col., 2011). Recientemente, se ha propuesto denominar esta enzima como AAC(2')-III y se ha observado que es capaz de acetilar también paromomicina y kanamicina B, pero no kanamicina A ni amikacina (Bordeleau y col., 2024). Atendiendo a los resultados, la mayoría de las bacterias AP^R presentan también resistencia o menor sensibilidad a paromomicina y sensibilidad a kanamicina A, por lo que podrían ser portadoras de la enzima AAC(2')-III o de alguna otra EMA no descubierta todavía.

Respecto a la resistencia a gentamicina, los dos mecanismos más frecuentes en *Staphylococcus* (y que quizá podrían ser también en gram positivas, no tan estudiadas hasta la fecha) son la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2'') y la enzima ANT(4')(4''). La primera implica resistencia a casi todos los aminoglucósidos de utilización clínica (excepto a estreptomicina cuya resistencia está mediada por otras EMAs, como se ha comentado), por lo que su expresión suele ir ligada a la resistencia a netilmicina y kanamicina, pero sensibilidad a amikacina; aunque puede expresarse también resistencia a amikacina cuando la enzima está sobreexpresada (Zarate y col., 2018). Ounissi y col. (1990) identificaron varias cepas de cocos gram positivos que presentaban un perfil AK^{R/S}, GM^R, K^R, NET^{R/S}, SIS^R, TB^R (tobramicina) similar al fenotipo de resistencia que muestran las cepas *S. warneri* de la AVL 2121 y *Microbacterium paraoxydans* 1111.34 y 5511.11. Estas cepas son potenciales portadoras del gen *aac(6')-aph(2'')*, que codifica para esta misma enzima, detectada tanto en plásmidos como transposones (Ramírez y Tolmasky, 2010; Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC, 2011). La segunda enzima, la ANT(4')(4''), codificada por genes *aadD* albergados en plásmidos o transposones, confiere un perfil de resistencia a tobramicina, amikacina y kanamicina, pero sensibilidad a

gentamicina (SEIMC, 2011; Torres y Cercenado, 2010). La enzima ANT(4')-I confiere además resistencia a dibekacina, diferenciándose de la ANT(4')-II, que no. Atendiendo a los resultados, las cepas *M. paraoxydans* 5511.9 y 5512.1, *S. epidermidis* 231.1 y *S. pasteurii* 321.4 y 72.7 podrían ser productores de la enzima ANT(4')-I, previamente detectada en *Bacillus* spp. (Ramírez y Tolmasky, 2010). La resistencia a kanamicina y amikacina también puede deberse a la enzima APH(3')-III, sin embargo, esta enzima va ligada a la resistencia a neomicina (Shaw y col., 1993) y ninguna de las cepas evaluadas demostró resistencia a este antibiótico. No obstante, se aprecia cierta disminución del halo de inhibición para este antibiótico (Tabla V.4) en la cepa *M. arborescens* 622.1 y en *P. agglomerans* 2132.7, por lo que estas cepas podrían ser portadoras de esta EMA; de hecho, el gen *aph(3')* que la codifica está ampliamente distribuido tanto en gram positivas, como gram negativas (Ramírez y Tolmasky, 2010).

La enzima AAC(6')-III expresa un fenotipo de resistencia únicamente a 2'-etil netilmicina. Aunque sólo se ha detectado en la bacteria gram negativa *Serratia marcescens* (Shaw y col., 1993), las cepas *M. paraoxydans* 5511.7, *Bacillus cereus* 1113.8, *Micrococcus luteus* 522.10, *S. equorum* 521.2 y 521.3, *S. epidermidis* 521.7 y *Kokuria rhizophila* 521.6 muestran resistencia a este antibiótico y podrían expresar una acetilasa análoga.

Varias cepas (*M. paraoxydans* 522.22, *M. arborescens/imperiale* de la AVL 211, *M. luteus* 522.12, *Paenibacillus glucanolyticus* 1113.17) presentan el fenotipo de resistencia DBK^R 2'NET^R y K^R o K_A^R, el cual puede deberse a una acetiltransferasa del tipo AAC(3'). Este grupo de acetilasas son capaces de acetilar estos y otros aminoglucósidos, englobando actualmente más de 10 tipos diferentes; se han visto ampliamente distribuidas en bacterias gram negativas, pero cada vez se detectan en más bacterias gram positivas, como en el caso de *Corynebacterium* (Galimand y col., 2015; Shaw y col., 1993).

Las cepas *M. paraoxydans* 1111.34, *Pseudoxanthomonas indica* 2121.22 y la cepa no identificada 2121.7 podrían poseer una combinación de varias enzimas, dado que presentan resistencia a la mayoría de los aminoglucósidos evaluados. Las acetilasas AAC(6) son capaces de acetilar la mayoría de los aminoglucósidos de importancia clínica, como amikacina, netilmicina, sisomicina, tobramicina, gentamicina C_{1A} y C₂, aunque son menos activas frente a gentamicina C₁. Este perfil podría encajar con estas cepas, ya que muestran mayor sensibilidad a gentamicina C₁, en comparación con los demás aminoglucósidos evaluados. Dentro de esta familia de acetiltransferasas, se ha detectado la AAC(6')-Ib-cr en *Enterobacterias*, asociada a transposones y con fluoroquinolonas como sustratos (Ramírez y Tolmasky, 2010). Según los resultados obtenidos, las cepas *M. paraoxydans* 5511.11 y *M. luteus* 142.1 presentan un perfil compatible

con esta enzima o una análoga, ya que muestran resistencia a todos los aminoglucósidos, excepto a la neomicina, y además son resistentes a fluoroquinolonas. Por otro lado, la enzima ANT(2'')-I, codificada en plásmidos, integrones y transposones, es común tanto en bacterias gram positivas como negativas y confiere resistencia a dibekacina, gentamicina, kanamicina, sisomicina y tobramicina (Ramírez y Tolmaski, 2010; Shaw y col., 1993); por tanto, las cepas que presentan resistencia a la mayoría de aminoglucósidos podrían ser también portadoras de esta enzima.

La resistencia a estos aminoglucósidos también puede estar mediada por bombas de eflujo y/o por metiltransferasas que modifican la diana. Por ejemplo, la resistencia a estreptomina en bacterias gram positivas puede estar ocasionada por metilasas Erm(B) o Erm(A), que modifican el ARNr 23 S; estas metilasas están además ligadas a resistencia a macrólidos (Torres y Cercenado, 2010), por lo que este mecanismo de resistencia podría encontrarse en varias de las cepas *B. clausii* de la AVL 1113. También se han descrito metilasas que confieren resistencia a apramicina, espectinomicina, gentamicina, sisomicina, higromicina o kanamicina (Doi y col., 2016; Nepal y col., 2010) y podrían estar presentes en las bacterias estudiadas.

En cualquier caso, lo expresado son hipótesis de los mecanismos que podrían subyacer teniendo en cuenta el fenotipo que presentan las bacterias (Tabla V.5); la determinación de los mecanismos de resistencia requiere análisis posteriores que pueden incluir técnicas moleculares, de secuenciación, hibridación, inmunocromatografía o clonación (March-Roselló, 2017; SEIMC, 2021) que podrían ser foco de interés para futuros estudios.

Tabla V.5. Perfil de resistencia a aminoglucósidos y posibles mecanismos de resistencia mediados por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) de las bacterias endocitobiontes (BE) de estudio.

ESTACIÓN	BE	PERFIL DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS	POSIBLES ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS
EM.5	<i>M. paraoxydans</i>	AK AP DK GM _B GM _{C1} GM _{C2} GM _{C1A} H K _A K _B 2'NET PM SIS SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(2')-III; AAC(6')-APH(2''); AAC(6')-Ib-cr; ANT(2'')-I
EM.1	<i>M. paraoxydans</i>	AK AP DK GM _B GM _{C1} GM _{C2} GM _{C1A} H K _A K _B 2'NET SIS SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(2')-III; AAC(6')-APH(2''); ANT(2'')-I; AAC(6)
EM.2	ni	AK AP DK GM _B GM _{C2} GM _{C1A} H K _A K _B 2'NET PM SPC ST	APH(7'')-Ia o APH(4)-Ia; ANT(3'')-I; AAC(3)-IV o AAC(2')-III; ANT(2'')-I; AAC(6)
EM.2	<i>P. indica</i>	AK DK GM _B GM _{C2} GM _{C1A} H K _A K _B 2'NET SIS SPC ST	APH(4)-Ia; ANT(3'')-I; ANT(2'')-I; AAC(6)
EM.2	<i>S. warneri</i>	DK GM _B GM _{C1} GM _{C2} GM _{C1A} H K _A K _B 2'NET SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(6')-APH(2''); ANT(2'')-I
EM.5	<i>M. paraoxydans</i>	AK AP DK GM _{C1} H K _A K _B 2'NET PM SIS SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(2')-III; ANT(4')-I
EM.5	<i>M. paraoxydans</i>	AK AP DK GM _{C1} H K _A 2'NET PM SIS SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(2')-III; ANT(4')-I
EM.1	<i>M. luteus</i>	AK AP DK H K _A K _B 2'NET SIS SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(2')-III; AAC(6')-Ib-cr
EM.3 y EM.7	<i>S. pasteurii</i>	DK GM _B H K _A K _B 2'NET SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; ANT(4')-I
EM.5	<i>M. luteus</i>	AP DK H K _A 2'NET PM SIS SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(2')-III; AAC(6')-III; AAC(3')
	<i>M. paraoxydans</i>	AP DK H K _A 2'NET PM SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(2')-III; AAC(3')
EM.2	<i>S. warneri</i>	GM _B GM _{C1} H K _A K _B PM SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(6')-APH(2'')
EM.2	<i>S. warneri</i>	DK GM _B H K _A K _B PM SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(6')-APH(2'')
EM.1	<i>P. glucanolyticus</i>	DK H K _A K _B 2'NET SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(6')-III; AAC(3')
EM.2	<i>S. epidermidis</i>	AP DK H K _A 2'NET PM SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(2')-III; ANT(4')-I
EM.6	<i>M. arborescens</i>		APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(2')-III; APH(3')-III
EM.2	<i>S. warneri</i>	GM _B H K _A K _B PM SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(6')-APH(2'')

AAC: aminoglucósido acetiltransferasa; AK: amikacina; ANT: aminoglucósido nucleotidiltransferasa o adenililtransferasa; AP: apramicina; APH: aminoglucósido fosfotransferasa; DK: dibekacina; GM: gentamicina; EM: estación de muestreo; H: higromicina; K: kanamicina; 2'NET: 2'-etil netilmicina; ni: BE no identificada; PM: paromomicina; SIS: sisomicina; SPC: espectinomicina; ST: estreptomina; **Microbacterium arborescens/imperiale*.

Tabla V.5. Perfil de resistencia a aminoglucósidos y posibles mecanismos de resistencia mediados por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) de las bacterias endocitobiontes (BE) de estudio. *Continuación.*

ESTACIÓN	BE	PERFIL DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS	POSIBLES ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS
EM.5	<i>M. paraoxydans</i> <i>M. luteus</i>	AP H 2'NET PM SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(2')-III; AAC(6')-III
EM.2	<i>M. arborescens</i> *	AP DK H 2'NET SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(2')-III; AAC(6')-III; AAC(3')
EM.5	<i>K. rhizophila</i>	AP 2'NET SPC ST	ANT(3'')-I; AAC(2')-III; AAC(6')-III
EM.6	<i>S. pasteurii</i>	AP GM H SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I; AAC(2')-III
EM.1	<i>B. clausii</i>	H K _A K _B SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I
EM.1	<i>B. clausii</i>	H K _A K _B ST	APH(7'')-Ia; ANT(6)-I o APH(6'')-I
EM.6	<i>S. equorum</i>	GM H SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I
EM.5	<i>S. equorum</i> <i>S. epidermidis</i>	H 2'NET SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(6')-III
EM.1	<i>B. clausii</i>	GM _{C1A} H ST	APH(7'')-Ia; ANT(6)-I o APH(6'')-I
EM.1	<i>B. clausii</i>	H K _B ST	APH(7'')-Ia; ANT(6)-I o APH(6'')-I
EM.1	ni	AP H K ST	APH(7'')-Ia; ANT(6)-I o APH(6'')-I; AAC(2')-III
EM.2	<i>P. agglomerans</i>	AP H SPC	APH(4)-Ia; APH(9); AAC(1); APH(3')-III
EM.7	<i>P. lautus</i>	AP H SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(2')-III
EM.4	<i>M. luteus</i>		
EM.1	<i>B. cereus</i>	H 2'NET SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I; AAC(6')-III
EM.1	<i>B. licheniformis</i>	H SPC ST	APH(7'')-Ia; ANT(3'')-I
EM.5	<i>B. niabensis</i>		
EM.6	<i>S. pasteurii</i>		

AAC: aminoglucósido acetiltransferasa; AK: amikacina; ANT: aminoglucósido nucleotidiltransferasa o adenililtransferasa; AP: apramicina; APH: aminoglucósido fosfotransferasa; DK: dibekacina; GM: gentamicina; EM: estación de muestreo; H: higromicina; K: kanamicina; 2'NET: 2'-etil netilmicina; ni: BE no identificada; PM: paromomicina; SIS: sisomicina; SPC: espectinomicina; ST: estreptomycin; **Microbacterium arborescens/imperiale*.

Tabla V.5. Perfil de resistencia a aminoglucósidos y posibles mecanismos de resistencia mediados por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) de las bacterias endocitobiontes (BE) de estudio. *Continuación.*

ESTACIÓN	BE	PERFIL DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS	POSIBLES ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS
EM.2	<i>S. epidermidis</i>	GM H	APH(7'')-Ia
EM.1	<i>B. clausii</i>	H ST	APH(7'')-Ia; ANT(6)-I o APH(6'')-I
EM.2	<i>P. koreensis</i>	H SPC	APH(4)-Ia; APH(9)
EM.1	<i>S. warneri</i>		
EM.1	<i>S. epidermidis</i>		
EM.6	<i>S. epidermidis</i>		
EM.6	<i>S. equorum</i>	H SPC	APH(7'')-Ia; ANT(9)-I
EM.6	<i>S. parteusi</i>		
EM.2	<i>S. pasteurii</i>		
EM.5	<i>S. pasteurii</i>		
EM.1	<i>B. clausii</i>	ST	ANT(6)-I o APH(6'')-I

AAC: aminoglucósido acetiltransferasa; AK: amikacina; ANT: aminoglucósido nucleotidiltransferasa o adenililtransferasa; AP: apramicina; APH: aminoglucósido fosfotransferasa; DK: dibekacina; GM: gentamicina; EM: estación de muestreo; H: higromicina; K: kanamicina; 2'NET: 2'-etil netilmicina; ni: BE no identificada; PM: paromomicina; SIS: sisomicina; SPC: espectinomicina; ST: estreptomycin; **Microbacterium arborescens/imperiale*.

1.3. PERFIL DE RESISTENCIAS DE LAS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

Tras la evaluación de la sensibilidad a antibióticos de diferentes familias, y a los aminoglucósidos con mayor profundidad, a continuación, se desarrollan y discuten los perfiles de resistencia encontrados en las diferentes bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA) estudiadas.

Perfil de resistencias de *Staphylococcus*

En el presente estudio, 34 de las cepas evaluadas resultaron pertenecer al género *Staphylococcus*, género bacteriano descrito en el Capítulo IV. Este género, debido a su relevancia clínica, ha sido ampliamente estudiado y cuenta con diversos protocolos para la caracterización fenotípica de resistencias a antibióticos. Por ello, y atendiendo a las guías del Comité Europeo de Estudio de la Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST, 2024), del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2020) y de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC, 2011), se evaluó la sensibilidad a antibióticos adicionales al panel general, como penicilina (betalactámico), cefoxitina (cefalosporina), clindamicina (lincosamida) y tetraciclina, sumando un total de 20 antibióticos evaluados. Tras analizar el perfil de resistencia, se detectan 25 perfiles de resistencia diferentes; encontrándose en todos ellos resistencia a higromicina y susceptibilidad a exposición aumentada de ciprofloxacino. En 16 de ellos (64 %) se observa también resistencia a macrólidos y, en 21 (84 %) a betalactámicos.

Respecto a los aminoglucósidos, se observa que todas las cepas son resistentes a higromicina (con valores de CMI entre 32 y >1024 µg/mL) y varias cepas son resistentes a kanamicina, gentamicina (CMI entre 8 y >256 µg/mL), apramicina (CMI entre 16 y 512 µg/mL) y estreptomicina (CMI entre 16 y >256 µg/mL). La resistencia a gentamicina en *Staphylococcus* spp. suele ir ligada a la enzima AAC(6')-APH(2''), codificada por el gen *aac(6')-aph(2'')*, que confiere resistencia a la mayoría de los aminoglucósidos de uso clínico excepto a la estreptomicina (SEIMC, 2011; Torres y Cercenado, 2010). La resistencia a estreptomicina se ha relacionado con la producción de enzimas ANT(6)-I y APH(3'')-I (Woodford, 2005; Zarate y col., 2018) y la resistencia a apramicina, con la acetiltransferasa codificada por el gen *apmA* (Fessler y col., 2011). La resistencia a kanamicina y sensibilidad a gentamicina se ha relacionado con la fosfotransferasa codificada por el gen *aph(3')-IIIa* (Domínguez col., 2002; Torres y Cercenado, 2010). Sin embargo, esta es la primera vez que se documenta la resistencia a higromicina en cepas de *Staphylococcus*.

La resistencia a macrólidos en *Staphylococcus* puede asociarse con diferentes fenotipos de sensibilidad o resistencia a lincosamidas (como la clindamicina). Por ello, se analizó la sensibilidad a clindamicina mediante la prueba “D”, tal como se describe en el Apartado III.3.2.1. Los resultados indican que la mayoría de las cepas resistentes a macrólidos presentan el fenotipo MS_B (resistencia a macrólidos y sensibilidad a clindamicina sin achatamiento del halo), que confiere resistencia a los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono (como eritromicina y azitromicina) y a las estreptograminas B. Esta resistencia está mediada por una bomba de expulsión activa, codificada normalmente por genes *msrA* presentes en plásmidos (SEIMC, 2011). La cepa *S. pasteurii* 32.4 muestra el fenotipo cMLS_B (resistencia a macrólidos y a clindamicina), indicativo de una resistencia constitutiva a macrólidos y lincosamidas. Esta resistencia puede deberse a modificaciones en la diana (ARN ribosómico, ARNr 23 S) por la acción de metilasas codificadas principalmente por genes *erm* o, aunque menos frecuente, por el gen de codificación plasmídica *cfr* (Ndagi y col., 2020). Este último gen confiere además resistencia a cloranfenicol, florfenicol, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptograminas A (SEIMC, 2011). Atendiendo al perfil de resistencia de la bacteria y su resistencia a cloranfenicol, este podría ser el mecanismo de resistencia presente en *S. pasteurii* 32.4; de hecho, este gen se ha descrito en *Staphylococcus* aislados de ganado bovino (Ndagi y col., 2020).

La resistencia de *Staphylococcus* spp. a betalactámicos también es frecuente, ya que la mayoría de las bacterias de este género producen betalactamasas. Precisamente, el fenotipo de resistencia a penicilina y sensibilidad a oxacilina es indicativo de la presencia de penicilinasas capaces de hidrolizar penicilinas (SEIMC, 2011). Tras analizar la sensibilidad a estos antibióticos, se puede observar que las cepas *S. warneri* 2121.3 y 2121.5 producen penicilinasas. Normalmente, estas betalactamasas son inducibles y se codifican en genes localizados en plásmidos que pueden transmitirse entre diferentes especies de *Staphylococcus*, pero también se ha observado su transmisión a *Enterococcus* (SEIMC, 2011). Por otro lado, el fenotipo de resistencia a cefoxitina es indicativo de producción de betalactamasas que conceden resistencia a un amplio espectro de agentes betalactámicos. Atendiendo a los resultados, todas las cepas *S. epidermidis* resultaron ser resistentes a cefoxitina y, por tanto, resistentes a meticilina y oxacilina (corroborado además por la resistencia a este segundo antibiótico). En la mayoría de los casos, esta resistencia se debe a la adquisición del gen *mecA*, localizado en un elemento genético móvil. Este gen codifica para una proteína fijadora de penicilina alternativa, la PBP2a, con baja afinidad por betalactámicos (Moses y col., 2024) y, por tanto, capaz de otorgar resistencia a estos antibióticos, a la combinación de betalactámico e inhibidor de betalactamasas, a varias cefalosporinas, monobactámicos y carbapenems (SEIMC, 2011;

EUCAST, 2024; CLSI, 2020). Las restantes cepas que muestran resistencia a oxacilina y/o ampicilina, probablemente presenten algún otro tipo de mecanismo de resistencia, el cual requeriría de otras pruebas para ser determinado, como la detección de betalactamasas mediante técnicas moleculares (Ruiz, 2020).

En cuanto al resto de antibióticos analizados, señalar la detección de dos cepas de *S. epidermidis* (521.7 y 643.2) resistentes a la combinación trimetoprim-sulfametoxazol, una de ellas también resistente a minociclina. La cepa *S. pasteurii* 32.4, ya mencionada anteriormente, es también resistente a minociclina y rifampicina; *S. pasteurii* 72.7 es resistente a cloranfenicol y rifampicina y la cepa *S. warneri* 2121.5 es resistente a tetraciclina. Todas estas resistencias son independientes del río del que provienen. En *Staphylococcus*, la resistencia a tetraciclinas puede deberse a bombas de eflujo o la producción de proteínas de protección ribosomal; la resistencia a trimetoprim se atribuye a la expresión de dihidrofolato reductasas con baja afinidad a este antibiótico; la resistencia a fenicoles puede deberse a inactivación enzimática, expulsión activa mediante transportadores, modificación de la diana o protección ribosomal (Ruiz, 2020); y la resistencia a rifampicina puede deberse a mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica una subunidad de la ARN polimerasa (Aubry-Damon y col., 1998).

Cabe señalar que se observan diferencias en los perfiles de resistencia dependientes de especie: todas las cepas de *S. epidermidis*, como se ha indicado, son meticilin-resistentes y presentan multirresistencia, mientras que todas las cepas de *S. equorum* son sensibles a macrólidos y ninguna es multirresistente. Estos resultados se han observado en estudios previos (Moses y col., 2024; Sierra, 2005; Vázquez y col., 2023).

Diversos autores también han aislado CONS (*Staphylococcus* coagulasa negativos) resistentes a penicilina, cefoxitina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, apramicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, ciprofloxacino, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, rifampicina y cepas multirresistentes de muestras ambientales ganaderos bovino, ovino y cunícola, en leche y otros alimentos de origen animal, así como en agua potable, aguas residuales, y agua salada (Brauge y col., 2024; Faria y col., 2009; Goñi y col., 2004; Moses y col., 2024; Schoenfelder y col., 2017; Silley y col., 2012; Soltan-Dallal y col., 2023; Wendlandt y col., 2015), sin embargo, esta es la primera vez que se describen aisladas del interior de AVL.

Perfil de resistencias de *Bacillus* y *Paenibacillus*

En el presente estudio, 20 de las cepas seleccionadas por su perfil de resistencia resultaron pertenecer al género *Bacillus*, género bacteriano descrito en el Capítulo IV. Tras analizar el perfil de resistencia al panel general compuesto por 16 antibióticos de diferentes familias, se detectaron 12 perfiles de resistencia diferentes; encontrándose en todos ellos resistencia a aminoglucósidos y macrólidos y, en 11 (92 %), resistencia a betalactámicos.

Respecto a la resistencia a aminoglucósidos, casi todas las cepas resultaron resistentes a higromicina (con CMI variables desde 4 hasta 512 µg/mL) y varias cepas de *B. clausii* y *B. licheniformis* y *B. niabensis* demostraron resistencia a apramicina, kanamicina y/o estreptomicina, esta última con valores de CMI ≥ 256 µg/mL. Todas las cepas resultaron sensibles a gentamicina, con valores de CMI entre 0,5 y 4 µg/mL. En estudios previos se han detectado cepas de *B. clausii* y *B. licheniformis* resistentes a kanamicina y estreptomicina debidas a la producción de la fosfotransferasa APH(3') en el caso de la kanamicina (Agerso y col., 2018) y a mutaciones puntuales cromosómicas en el gen *rpsL* de la proteína ribosómica S12 (Abbrescia y col., 2014) o a la presencia de adenililtransferasas codificadas por el gen *aadD2* (Bozdogan y col., 2003), en el caso de la estreptomicina. Destacan los valores de CMI obtenidos para estreptomicina: en todas las cepas de *Bacillus* evaluadas presentan valores de CMI ≥ 256 µg/mL, superiores a los reportados en otras cepas resistentes a este antibiótico (Adimpong y col., 2012). La sensibilidad a gentamicina en cepas de *Bacillus* también se ha reportado en otros estudios (Adamski y col., 2023; Adimpong y col., 2012); sin embargo, y hasta donde la autora conoce, esta es la primera vez que se describen cepas del género *Bacillus* resistentes a higromicina y apramicina y *B. niabensis* resistente a estreptomicina. Otros investigadores también han aislado cepas de *Bacillus* resistentes a cloranfenicol, minociclina, la combinación sulfadiazina-trimetoprim y quinolonas (Adamski y col., 2023; Adimpong y col., 2012; Anokyewaa y col., 2021; Senesi y col., 2001; Zhai y col., 2022).

La resistencia a macrólidos, concretamente a eritromicina, se ha detectado previamente en diferentes especies de *Bacillus*, como *B. licheniformis*, *B. clausii* o *B. cereus*, codificada tanto por genes plásmidos como cromosómicos (Adamski y col., 2023; Adimpong y col., 2012). En el caso de *B. cereus*, la resistencia a macrólidos parece que puede ser tanto intrínseca como adquirida, dependiendo de la cepa (Wang y col., 2015).

Otros investigadores también han obtenido altos porcentajes de cepas de *Bacillus* resistentes a betalactámicos y cefalosporinas (Gao y col., 2018; Soundhararajan y Srinivasan, 2024). De hecho, Zhai y col. (2022) detectaron un alto porcentaje de *Bacillus*, entre ellos *B. pumilus*, *B.*

licheniformis y *B. cereus*, con resistencia intrínseca a estos antibióticos, capaces de producir betalactamasas y proteínas de unión a penicilina. Sin embargo, las dos cepas de *B. pumilus* analizadas en el presente estudio son sensibles a ampicilina, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Branquinho y col. (2015).

De las 20 cepas evaluadas, 18 presentan perfil de multirresistencia. Destacan las cepas *B. cereus* 1113.8 y *B. licheniformis* 142.2 por presentar multirresistencia extendida a 5 y 6 familias, respectivamente, las cuales se extrajeron de AVL aisladas del río Segre a su paso por Lérida (EM.1). En otros estudios, también se han aislado cepas multirresistentes de *B. cereus*, *B. licheniformis* y *Bacillus* spp. a partir de muestras ambientales como aguas residuales (Shen y col., 2024) e instalaciones ganaderas del sector ovino y bovino (Abbas y col., 2023; Adamski y col., 2023; Santamarina-García y col., 2024); no obstante, esta es la primera vez que se describen cepas de *Bacillus* resistentes a antibióticos aisladas del interior de AVL.

Las dos cepas de *Paenibacillus* spp. detectadas se analizan también según los puntos de corte de *Bacillus* spp., tal y como indica la guía CLSI (2015). Se observa de esta forma que ambas cepas son resistentes a betalactámicos y aminoglucósidos, pero sus perfiles de resistencia son diferentes: *P. glucanolyticus* es además resistente a macrólidos, cloranfenicol y minociclina, considerándose cepa de multirresistencia extendida, mientras que *P. lautus* es resistente a quinolonas y fluoroquinolonas, considerándose cepa multirresistente.

Respecto a los aminoglucósidos, ambas cepas son resistentes a higromicina, con valores de CMI de 256 µg/mL, *P. lautus* es resistente a apramicina, con una CMI de 32 µg/mL, y *P. glucanolyticus* es resistente a kanamicina y estreptomina, esta última con valores de CMI de 256 µg/mL. La resistencia a estreptomina y kanamicina se ha observado en *Paenibacillus* spp. (Abbas y col., 2023; Lata y col., 2017; Pawlowski y col., 2016), pero no se ha evaluado el mecanismo de resistencia. La resistencia a apramicina y espectinomicina también ha sido reportada, pero se midió mediante antibiogramas con discos de 4 µg (Kochansky y col., 2001), una carga inferior a la empleada en el presente trabajo y a la establecida por las guías de referencia. Se ha detectado la resistencia de *Paenibacillus* a otros aminoglucósidos (Pednekar y col., 2010), pero parece que esta es la primera vez que se reporta la resistencia a higromicina en este género bacteriano.

En estudios previos se han aislado cepas de *P. lautus* y *P. glucanolyticus* resistentes a ampicilina, minociclina, estreptomina y ciprofloxacino, así como otras cepas de *Paenibacillus* resistentes a betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y cloranfenicol y con perfiles de multirresistencia en muestras ambientales variadas, incluyendo granjas de ganado bovino y vacuno, así como digestores de estiércol (Abbas y col., 2023; Pednekar y col., 2010; Sanz-Nieto y col., 2017; Sun y

col., 2020). Sin embargo, hasta la fecha, nunca se habían detectado cepas resistentes en el interior de AVL.

Perfil de resistencias de *Microbacterium*

En el presente estudio, 12 de las cepas seleccionadas por su perfil de resistencia resultaron pertenecer al género *Microbacterium*, género bacteriano descrito en el Capítulo IV. Según la guía CLSI (2015), la sensibilidad de estas bacterias se ha de interpretar con los puntos de corte establecidos para *Corynebacterium* spp. Atendiendo a los antibióticos recomendados, se evalúa adicionalmente la sensibilidad de las cepas de *Microbacterium* a tetraciclina; de esta forma, se estudia su sensibilidad a un total de 17 antibióticos.

Tras analizar el perfil de resistencia, se detectaron 8 perfiles de resistencia diferentes; encontrándose en todos ellos resistencia a oxacilina, apramicina, higromicina y, en 7 de ellos (88 %), también a ácido nalidíxico. Las bacterias pertenecientes al género *Corynebacterium*, no poseen topoisomerasa IV (una de las dianas de las quinolonas), por lo que las mutaciones en el gen *gyrA* son frecuentemente el motivo de resistencia a quinolonas en este género de bacterias (CLSI, 2015; Sierra, 2005). Esta resistencia también puede estar mediada por la expresión de bombas de expulsión, lo cual suele asociarse con la resistencia a ciprofloxacino (Sierra, 2005), mecanismo que podría encontrarse en las cepas *M. paraoxydans* 522.22 y 5511.11. Recientemente se ha detectado una enzima glutamina sintetasa (gen *glnA*) capaz de N-acetilar norfloxacino y producir bajo nivel de resistencia a este antibiótico en una cepa de *Microbacterium* aislada de una estación depuradora de aguas residuales (Kim y col., 2013).

Cabe señalar que se observan diferencias en los perfiles de resistencia dependientes de especie: todas las cepas de *M. arborescens/imperiale* muestran resistencia a la combinación de sulfadiazina-trimetoprim, mientras que todas las cepas de *M. paraoxydans* muestran resistencia a macrólidos. La resistencia a eritromicina en corinebacterias casi siempre se atribuye a la presencia del gen *ermX* y, ocasionalmente, al gen *ermB* (CLSI, 2015). Estos genes, que pueden expresarse de forma constitutiva o inducible, codifican enzimas que metilan el ARNr 23 S (Cobos-Trigueros y col., 2009). La resistencia a rifampicina también se encuentra extendida en las bacterias de estudio, al detectarse en 4 de 6 cepas, y a tetraciclina, siendo resistentes 3 de 6 cepas evaluadas. Es posible que la resistencia a estos antibióticos esté influenciada por la zona de estudio, al haberse detectado todos los casos en bacterias que pertenecen a AVL aisladas del río Alcanadre a su paso por Sariñena (EM.5). Otras tres cepas mostraron resistencia a ciprofloxacino, cloranfenicol y a sulfametoxazol-trimetoprim.

Respecto a los aminoglucósidos, todas las cepas de *Microbacterium* resultaron resistentes a apramicina (con valores de CMI entre 64 y 512 µg/mL) e higromicina (con valores de CMI entre 32 y 256 µg/mL); además, varias cepas de *M. paraoxydans* resultaron resistentes a kanamicina, gentamicina (con valores de CMI entre 8 y 16 µg/mL) y/o estreptomicina (con valores de CMI ≥ 128 µg/mL). Estudios previos han reportado cepas de *M. paraoxydans* resistente a gentamicina (con valores de CMI > 16 µg/mL) aisladas de verdura (Yi y col., 2022) y cepas de *M. arborescens* y *M. imperiale* (con valores de CMI entre 8 y 64 µg/mL) en muestras clínicas (Funke y col., 1995). también se han reportado cepas de *M. paraoxydans* y otros *Microbacterium* spp. resistentes a kanamicina y estreptomicina aislados de muestras ambientales (Ignasiak y Maxwell, 2017; Ozaktas y col., 2012); sin embargo, parece que este es el primer estudio en el que se aíslan cepas de *Microbacterium* resistentes a apramicina e higromicina.

La resistencia a ampicilina, kanamicina, estreptomicina, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacino, rifampicina, tetraciclina, sulfadiazina-trimetoprim y oxacilina (Bernard y Pacheco, 2015; Gneiding y col., 2008; Ozaktas y col., 2012; Yi y col., 2022) se ha reportado en cepas de *Microbacterium* spp. previamente, tanto en muestras ambientales como clínicas, pero nunca antes se habían descrito en el interior de AVL.

Todos los perfiles de resistencia detectados en las cepas de *Microbacterium* evaluadas corresponden a perfiles de multirresistencia, lo cual, coincide con las observaciones de Bernard y Pacheco (2015), quienes indican que las cepas de *Microbacterium* spp. tienden a ser multirresistentes, sin importar la especie. Cuatro de los perfiles, todos ellos pertenecientes a cepas de *M. paraoxydans*, presentan además multirresistencia extendida. En otros estudios también se han aislado cepas multirresistentes de *M. paraoxydans* a partir de muestras ambientales (Campista-León y col., 2022); sin embargo, la información relativa a resistencias en cepas de *M. arborescens/imperiale* es muy escasa aun habiéndose detectado esta especie en muestras clínicas (Funke y col., 1995).

Perfil de resistencias de *Micrococcus* y *Kocuria*

El estudio de la sensibilidad de las cepas de *Micrococcus* spp. y *Kocuria* spp. se adapta a partir de la información disponible para *Staphylococcus* spp., tal y como indica la guía CLSI (2015). En el caso de *M. luteus*, se observa que las cuatro cepas aisladas, pese a haberse aislado de AVL que pertenecen a diferentes ríos (EM.1, EM.4 y EM.5), presentan similitudes en su perfil de resistencias: todas son resistentes a higromicina (con valores de CMI de 128 µg/mL) y ácido nalidíxico, tres además son resistentes a oxacilina, kanamicina y apramicina (con valores de CMI

entre 64 y 256 µg/mL). Las cepas 4412.5 y 522.10 muestran resistencia a macrólidos y la cepa 142.1 también presenta resistencia a estreptomicina (CMI = 64 µg/mL); todas las cepas de *M. luteus* exhiben sensibilidad a gentamicina (con valores de CMI entre 2 y 4 µg/mL).

La resistencia a betalactámicos, macrólidos, aminoglucósidos y (fluoro)quinolonas ya se ha reportado en cepas de *M. luteus* tanto en muestras humanas como ambientales y ganaderas (Atencio y col., 2009; Eady y col., 2000; Pekala y col., 2018; Nishimura y col., 2005; Oliveira y col., 2022); sin embargo, este es el primer estudio hasta la fecha en el que se demuestra la resistencia cepas de *M. luteus* a apramicina e higromicina. Además, es también el primer registro de cepas de *M. luteus* resistentes a antibióticos aisladas de AVL.

Como puede observarse, todas las cepas de *Micrococcus* resultaron ser multirresistentes. Recientemente, y mediante secuenciación, se ha identificado la presencia de genes que codifican bombas de eflujo de “multi-antibióticos” en una cepa de *M. luteus* aislada de suelo (Lean y col., 2021); sin embargo y, hasta donde la autora conoce, sólo se han detectado cepas multirresistentes de esta especie en muestras clínicas (Oliveira y col., 2022), no en ambientales.

En cuanto a las dos cepas de *Kocuria* evaluadas, los resultados parecen coincidir con estudios previos en los que se ha demostrado que las cepas de este género tienden a ser sensibles a la mayoría de los antibióticos (Ozatkas y col., 2012; Pekala y col., 2018). Se observa que ambas cepas muestran resistencia a oxacilina y sensibilidad a exposición aumentada o resistencia a ciprofloxacino; la cepa 2132.6 además es resistente a ácido nalidíxico y la cepa 521.6 mostró resistencia a apramicina y estreptomicina. La resistencia a estreptomicina y quinolonas, entre ellas ácido oxolínico (quinolona de primera generación como el ácido nalidíxico) se ha detectado en cepas de *K. rhizophila* infectando a truchas (Pekala y col., 2018); por otro lado, la resistencia a oxacilina y fluoroquinolonas se ha observado en casos clínicos (Pierron y col., 2021; Zhang y col., 2023b). No obstante, este parece ser el primer estudio en el que se detectan cepas de *K. rhizophila* resistentes a apramicina y, además, cepas resistentes a antibióticos en el interior de AVL. Atendiendo a los resultados, no se ha detectado ninguna cepa de *Kocuria* multirresistente, pero sí se ha documentado su existencia tanto en ganado vacuno (Oliveira y col., 2022), como en casos clínicos (Fowora y col., 2023; Sivarman y col., 2016).

Perfil de resistencias de bacterias gram negativas: *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* y *Pantoea*

En el presente estudio, se identificaron tres cepas de bacterias endocitobiontes gram negativas. Por un lado, y atendiendo a los antibióticos betalactámicos recomendados para *Pseudomonas* (EUCAST, 2024; CLSI, 2015, 2020), se evalúa la sensibilidad de la cepa *P. koreensis* 2132.2 a piperacilina, cefepima, ceftazidima, meropenem, imipenem y aztreonam, en vez de ampicilina, oxacilina y ceftriaxona. De esta forma, se evalúa la sensibilidad de ambas cepas a un total de 19 antibióticos. Atendiendo a los resultados, la cepa *P. koreensis* 2132.2, es resistente a cefepima y aztreonam. La disminución en *Pseudomonas* de la susceptibilidad a betalactámicos es parcialmente debido a la disminución en el número y la variación de expresión de porinas (Ndagi y col., 2020), aunque es muy frecuente la presencia de betalactamasas y proteínas de unión a penicilina (Heir y col., 2021).

Esta cepa también muestra resistencia a los macrólidos evaluados (azitromicina y eritromicina), lo cual es comprensible ya que las *Pseudomonas* se consideran intrínsecamente resistentes, aunque recientemente se ha puesto en duda este hecho (Goltermann y col., 2022). Un estudio genómico detectó la presencia de genes que codifican para transportadores y bombas de eflujo de macrólidos en una cepa de *P. koreensis* ambiental, los cuales podrían ser los causantes de esta resistencia (Gu y col., 2020). Ante las dudas y al considerarse habitualmente resistencia intrínseca, no se considera esta en el cálculo del índice MRA (Tabla V.2).

Se han aislado cepas de *P. koreensis* resistentes a cefalosporinas, monobactámicos y macrólidos en purín de ganado vacuno, suelos de granjas, el sector lácteo, peces y estaciones de tratamiento de agua potable (Abbas y col., 2023; Lau y col., 2024; Sala-Comorera y col., 2016; Yi y col., 2024) y, aunque no se han aislado cepas de *P. koreensis* resistentes a partir de AVL, sí se han descrito cepas endocitobiontes de *Pseudomonas* resistentes a amoxicilina, eritromicina, estreptomicina, cloranfenicol y cefalotina (Carstens y col., 2014).

Hasta la fecha, no se ha establecido ningún tipo de referencia para evaluar la sensibilidad a *Pseudoxanthomonas*. Por ello, se evalúa la sensibilidad de la cepa *P. indica* 2121.22 según los puntos de corte de *Pseudomonas* al ser este el género más cercano taxonómicamente entre los presentes en las guías utilizadas (EUCAST, 2024; CLSI, 2015, 2020). Atendiendo a los resultados, esta cepa es resistente a la mayoría de aminoglucósidos evaluados: gentamicina (CMI = 2 µg/mL y diámetro de los halos de inhibición a GM_B , GM_{C2} , $GM_{C1A} \leq 10$ mm), higromicina (CMI > 1024 µg/mL), kanamicina y estreptomicina (CMI = 64 µg/mL), además de a ampicilina y oxacilina. La resistencia a este último antibiótico es esperable ya que la oxacilina suele emplearse frente a

bacterias gram positivas debido a que las gram negativas suelen expresar resistencia mediante oxacilinasas u otras betalactamasas (June y col., 2014; Papich, 2016). Por ello, no se considera en el cálculo del índice MRA (Tabla V.2).

El presente estudio supone la primera descripción del perfil de resistencia de una cepa de *P. indica*, aislada además del interior de una AVL y, aunque la cepa aislada no sea multirresistente y pese a la poca literatura disponible relativa a la resistencia a antibióticos de este género, recientemente Selvaraj y col. (2022) aislaron una cepa de *P. mexicana* multirresistente a ampicilina, estreptomicina, kanamicina y sulfametoxazol a partir de aguas residuales; por lo tanto, cabe esperar que en futuros estudios se aislen cepas de *P. indica* multirresistentes.

Por último, el género *Pantoea* se evalúa según los puntos de corte de *Enterobacteriaceae*, al pertenecer a esta familia de bacterias. Atendiendo a los resultados, la cepa *P. agglomerans* 2132.7, es resistente a oxacilina (resistencia esperable y no se considerada en el cálculo del índice MRA), higromicina (CMI = 256 µg/mL), kanamicina, azitromicina, eritromicina y ácido nalidíxico, mostrando por tanto un perfil de multirresistencia. La resistencia a betalactámicos y a aminoglucósidos se ha relacionado con la producción de betalactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, mientras que la resistencia a quinolonas se ha relacionado con mutaciones puntuales de los genes *gyrA* y/o *parC* y la producción de proteínas Qnr que protegen las dianas de la inhibición de quinolonas (Markovska y col., 2019). La resistencia a macrólidos parece ser frecuente en esta especie bacteriana (Buligina y col., 2016; Mukuna y col., 2023) y suele deberse a la producción de bombas de eflujo (Gomes y col., 2016b). Estas resistencias, así como fenotipos de multirresistencia, se han detectado en cepas de *P. agglomerans* aisladas de muestras clínicas (Hussein y col., 2020; Sharma y col., 2012) y muestras ambientales (Delik y col., 2024; Satcioglu y col., 2018), excepto en el caso de la resistencia a higromicina, constituyéndose este como el primer estudio en el que se describe una cepa de *P. agglomerans* resistente a este antibiótico. Además, este es la primera vez que se documenta la presencia de cepas de esta especie resistentes a antibióticos en el interior de una AVL.

2. ESTUDIOS PREVIOS Y DEFINICIÓN DE NUEVAS BACTERIAS

ENDOCITOBIONTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS (BERA)

Hasta la fecha, se ha demostrado la capacidad de las AVL de depredar bacterias resistentes a antibióticos (BRA) y protegerlas de tratamientos de desinfección (Bornier y col., 2021; Sarink y col., 2020), pero apenas se ha evaluado la presencia y el perfil de resistencias de BRA en el interior de amebas. En un estudio realizado en Sudáfrica, Carstens y col. (2014), evaluaron la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en AVL aisladas a partir de aguas subterráneas; en total aislaron 14 BE (*Achromobacter* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Comamonas odontotermitis*, *Ochrobactrum* sp. y varias *Pseudomonas* spp.) y todas, excepto un aislamiento (el 93 % de las BE), mostraron resistencia a tres o más familias de antibióticos. Las resistencias más recurrentes fueron a betalactámicos, macrólidos y cloranfenicol, sumado a esto, más de la mitad de las BE mostró resistencia a estreptomicina. Estas resistencias frecuentes muestran parecido a los resultados obtenidos en el presente trabajo, excepto en el caso del cloranfenicol; la elevada presencia de BE resistentes a este antibiótico en el estudio de Carstens y col. puede deberse a que las muestras de agua subterránea se tomaron en su mayoría en zonas urbanas. En un hospital en Perú, aislaron *Mycobacterium gordonae* del interior de una *Acanthamoeba* y, analizando sus genes de resistencia a antibióticos (GRA), detectaron genes de resistencia a fosfomicina, rifamicinas, macrólidos y aminoglucósidos (Cabello-Vílchez y col., 2022). Con resultados completamente opuestos, Delumeau y col. (2023) realizaron un estudio en aguas termales naturales de Guadalupe (en el Caribe) y detectaron que las BE aisladas a partir de AVL (*Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Paravahlkampfia*) no presentaban resistencias adquiridas, únicamente mostraban resistencias naturales (Delumeau y col., 2023). Recientemente, y con el auge de la secuenciación masiva, en un estudio en Sudáfrica, Conco-Biyela y col. (2024) aislaron AVL a partir de efluentes clorados de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y analizaron su microbioma. Detectaron genes de resistencia a 15 clases de antibióticos, entre ellos aminoglucósidos, trimetoprim, sulfonamidas, macrólidos, betalactámicos y cefalosporinas, quinolonas, tetraciclinas, fenicoles, rifamicinas y lincosamidas. En dicho estudio, el GRA dominante fue a aminoglucósidos (*aph6*), seguido de resistencia a trimetoprim (*dfrA15* y *dfrA5*), sulfonamidas (*sulI* y *SulII*), y macrólidos (*msrA* y *mphC*), aunque ha de señalarse que la presencia de GRA no implica necesariamente la expresión fenotípica de su resistencia (Deekshit y Srikumar, 2022).

Comparando el origen de estas bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos o con GRA (un hospital, aguas subterráneas susceptibles de contaminación minera, agrícola, municipal y

séptica, así como dos EDAR), y a pesar de la poca literatura al respecto, parece que la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en el interior de AVL está influenciada por actividades humanas y el consecuente impacto de los antibióticos (Cabello-Vílchez y col., 2022; Carstens y col., 2014; Conco-Biyela y col., 2024). El único estudio en el que, al evaluar la resistencia de las BE extraídas de AVL, no se detectaron resistencias adquiridas fue en el estudio realizado en aguas termales de Guadalupe (Delumeau y col., 2023). Estas aguas origen volcánico (25 – 40 °C) probablemente no están expuestas a contaminación por antibióticos. De esta misma manera, cabe esperar que las actividades humanas de la zona de estudio influyan en el perfil de resistencias de las BE del presente estudio y, precisamente, así lo reflejan los resultados, al resultar el 74 % de las BE multirresistentes, presentes en 20 de las 21 AVL evaluadas (95 %) y el índice MRA > 0,2 en el 73 % de las BE estudiadas, indicativo de que las bacterias provienen de una alta presión antibiótica. Aún así, no puede subestimarse el potencial papel de las AVL en la aparición y diseminación de resistencias. Estos dos factores (el papel de las AVL y de las actividades ganaderas) se discuten en los Apartados 4 y 5 del presente capítulo.

Atendiendo a la bibliografía disponible, merece la pena subrayar que este es, hasta donde la autora conoce, el estudio más completo de bacterias resistentes a antibióticos aisladas del interior de AVL. Así mismo, este es el primer registro de cepas de *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Microbacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Kocuria* spp., *Pantoea* spp., *Pseudoxanthomonas* spp. y *Staphylococcus* spp. resistentes a antibióticos aisladas del interior de amebas de vida libre.

3. ESTUDIO GENOTÍPICO DE LAS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES: PRESENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES

Tras evaluar el perfil de resistencias de las bacterias endocitobiontes (BE) y con el objetivo de determinar la presencia de integrones que confieren resistencia a antibióticos a las BE, se analiza la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3 de una selección que de las 62 cepas que presentan los perfiles de resistencia (tanto generales como a aminoglucósidos) más relevantes. Para ello, se amplifican los genes *int1*, *int2* e *int3*, que codifican las integrasas 1, 2 y 3, respectivamente, y posteriormente se caracterizan los integrones detectados. Se estudian estas clases de integrones debido a su frecuente asociación con elementos genéticos móviles (EGM) ya que, los integrones de clase 4 suelen encontrarse en cromosomas y los integrones de clase 5 en adelante tienen una prevalencia mundial muy baja y se han investigado escasamente (Deng y col., 2015; Partridge y col., 2018).

3.1. PRESENCIA DE INTEGRONES

La presencia de integrones de la selección de bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA) de interés se realiza siguiendo la metodología descrita en el Apartado III.3.3. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.6 e indican que, en total, 47 cepas (76 %) resultaron ser positivas para la presencia de genes *int1*, *int2* y/o *int3*. La detección de cepas positivas para estas PCR supone la existencia de integrones capaces de incorporar casetes genéticos (Ruíz, 2007). Estos casetes genéticos se localizan en regiones variables de los integrones tras integrarse entre dos sitios de recombinación y, generalmente, codifican genes de resistencia frente a antibióticos. Un mismo microorganismo puede incorporar y acumular varios casetes en los integrones, convirtiendo a estos EGM en reservorios genéticos que les permite adaptarse rápidamente a las diferentes presiones selectivas y que, además, pueden compartirse entre bacterias. Hasta la fecha se han identificado más de 130 genes de resistencia a antibióticos (GRA) distintos, capaces de conferir resistencia a la mayoría de los betalactámicos, a todos los aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim, rifamicinas, eritromicina y quinolonas, entre otros (Deng y col., 2015). Por tanto, los integrones detectados en las BERA estudiadas podrían contener los genes (o algunos de ellos) responsables de los fenotipos de resistencia, especialmente teniendo en cuenta que la mayoría de las cepas positivas para la presencia de integrones presentan fenotipos de multirresistencia (76 %), lo cual se asemeja a los resultados

obtenidos por otros autores (Lim y col., 2009). En la Tabla V.7 se recoge la información relativa al estudio fenotípico y genotípico de las BERA.

Tabla V.6. Número de bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA), clasificadas por género, con perfiles de multirresistencia (MR) o multirresistencia extendida (MXR), positivas para integrones de clase 1 (INT1), clase 2 (INT2), clase 3 (INT3) y para la caracterización mediante cebadores CS y ORFX.

GÉNERO	ESTACIÓN	Nº BERA	MR	MRX	INT1	INT2	INT3	CS	ORFX
<i>Bacillus</i>	EM.1	10	8	2	8	8	9	3	7
	EM.3	1	1	0	1	0	1	1	0
	EM.5	4	2	0	4	4	2	4	4
<i>Kocuria</i>	EM.2	1	0	0	1	0	0	1	0
	EM.5	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microbacterium</i>	EM.1	1	1	0	1	0	0	1	0
	EM.2	5	5	0	5	0	0	5	0
	EM.5	5	1	4	3	1	0	0	0
	EM.6	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	EM.1	1	1	0	0	0	1	0	0
	EM.5	2	2	0	0	0	1	0	0
ni	EM.2	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Paenibacillus</i>	EM.1	1	0	1	0	1	1	0	1
	EM.7	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pantoea</i>	EM.2	1	1	0	1	0	0	1	0
<i>Pseudomonas</i>	EM.2	1	0	0	1	1	1	1	1
<i>Pseudoxanthomonas</i>	EM.2	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Staphylococcus</i>	EM.1	2	1	0	2	0	0	0	0
	EM.2	9	3	0	4	0	2	4	0
	EM.3	1	0	1	1	1	1	0	1
	EM.4	1	1	0	1	0	0	0	0
	EM.5	4	3	1	0	0	0	0	0
	EM.6	6	4	0	5	1	2	1	0
	EM.7	1	0	1	1	0	1	1	0
TOTAL		62	36	10	41	17	22	25	14

EM: estación de muestreo; ni: no identificada.

En el presente trabajo, se detectó la presencia del gen *int1* en 41 BE (66 %). Para caracterizar esta clase de integrones, se realizó una segunda PCR mediante los cebadores 5'CS-F y 3'CS-R a las 41 BE portadoras de *int1*. Mediante el proceso de caracterización, se obtuvieron 25 muestras positivas, de las cuales, se pudieron secuenciar 18 amplicones pertenecientes a 7 bacterias endocitobiontes de los ríos Segre, Noguera Ribagorzana y Alcanadre (EM.1, EM.2 y EM.5, respectivamente), como se indica en la Tabla V.7. Entre las secuencias de integrones de clase 1 que se pudieron estudiar (Tabla V.8), se encuentran genes que codifican proteínas involucradas en la resistencia a antibióticos (como el regulador transcripcional TetR), en posibles mecanismos de resistencia (como TrmK, glicosiltransferasas, deshidratasas MaoC, hidrolasas α - β o el

transportador MFS), en virulencia de plantas (como el Efecto tipo III) y en la formación de biofilm (como amidasas o la proteína LCP).

Aunque la mayoría de los estudios disponibles relativos a integrones se han enfocado en bacterias gram negativas responsables de infecciones clínicas, se ha comprobado que esta clase de integrones también está ampliamente diseminada en muestras ambientales, como estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o ríos (Chen y col., 2019; Ma y col., 2013; Marathe y col., 2017; Tchuente y col., 2016). De hecho, se ha propuesto como indicador de contaminación antropogénica (Gillings y col., 2015), por lo que, observando los resultados obtenidos, se puede presumir que toda la zona de estudio está impactada por actividades humanas.

Los integrones de clase 1 poseen unas regiones conservadas con los genes *qacEΔ1* y *sul1*, que codifican resistencia a sales de amonio cuaternario y a sulfonamidas, respectivamente. Por tanto, cabría esperar la resistencia a sulfonamidas (no evaluada) en las BE que presentan esta clase de integrones. Esta clase de integrones se ha asociado con una variedad de casetes genéticos, aunque la mayoría contienen determinantes de resistencia *aadA*, que codifican la resistencia a estreptomicina-espectinomicina, y con frecuencia *dfrA*, que codifica resistencia a trimetoprim (Deng y col., 2015). Resulta reseñable que 35 de las 41 cepas positivas para integrones de clase 1 (85 %) son resistentes a al menos uno de estos antibióticos (ha de tenerse en cuenta que a cinco cepas que no cumplen esta característica, no se les evaluó la sensibilidad a espectinomicina); por otro lado, las cepas *B. cereus* 1113.8, *B. licheniformis* 35.1 y *M. arborsecens/imperiale* de la AVL 211 son SXT^R y podrían poseer el gen *dfrA* en el integron de clase 1 que portan (Tabla V.7).

En cuanto a los integrones de clase 2, se detectó su presencia en 17 (27 %) de las BE evaluadas (Tabla V.6). Para caracterizar estos integrones, se realizó una segunda PCR mediante los cebadores ATTI2-F y ORFX-R a las bacterias portadoras de *intI2*. Se obtuvieron 14 muestras positivas, de las cuales, se pudieron secuenciar 6 amplicones pertenecientes a 5 BERA de los mismos ríos que en el caso de los integrones de clase 1 (Segre, Noguera Ribagorçana y Alcanadre, o sea EM.1, EM.2 y EM.5, respectivamente), como se muestra en la Tabla V.7. Entre las secuencias pertenecientes a integrones de clase 2 que pudieron estudiarse (Tabla V.8), se encuentran genes que codifican proteínas involucradas en la resistencia a antibióticos (transportador ABC), en posibles mecanismos de resistencia (glutaminasa) y la motilidad (proteínas YdgA).

Según la bibliografía, se ha observado una menor diversidad de casetes en esta clase de integrones (en comparación con la clase 1), siendo los más reportados *dfrA1*, *sat1* y *aadA1*, atribuibles a la resistencia a trimetoprim, estreptomicina y estreptomicina/espectinomicina, respectivamente. Esto se ha asociado a que la mayoría de los aislamientos con integrones de clase 2 presentan un codón stop interno en la secuencia que hace que la integrasa sea inactiva, restringiendo su capacidad de adquirir nuevos casetes genéticos y conservando los presentes. Sin embargo, se ha demostrado que las integrasas de clase 1 pueden reconocer los sitios de recombinación de la clase 2. También se han detectado integrones de clase 2 funcionales, sin ese codón de stop, portadores del gen de resistencia a trimetoprim *dfrA1*, más frecuentemente asociado con integrones de clase 1 (Gillings, 2014).

Atendiendo a los resultados, ninguna de las cepas positivas para integrones de clase 2 mostró resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim y el 88 % (15 de 17) resultaron positivas para integrones de clase 1. Esto podría indicar que la mayoría de los integrones de clase 2 detectados sean inactivos y empleen la integrasa de clase 1 para integrar nuevos casetes genéticos, lo cual podría explicar la diversidad de genes identificados en estos integrones (Tabla V.8). Además, 14 de las 17 cepas positivas para el gen *intI2* son resistentes a estreptomicina y/o espectinomicina (Tabla V.7), por lo que podrían ser portadoras de los conservados genes de resistencia *sat1* y/o *aadA1*.

Estas dos clases de integrones se consideran las más comunes entre bacterias resistentes (Collis y col., 2002). Por ello, resulta reseñable la elevada tasa de BERA que contienen integrones de clase 3: 22 cepas (35 %), de las cuales 19 son multirresistentes, mientras que en diversos estudios no se ha encontrado ninguna cepa portadora de esta clase de integrones (Gillings, 2014; González-Villalobos y col., 2022; Lim y col., 2009; Ploy y col., 2000). Es posible que estos integrones sean más frecuentes en bacterias gram positivas, las cuales han sido mucho menos estudiadas en lo que respecta a la presencia de integrones.

Pese a haber sido menos estudiados, se han encontrado integrones de clase 3 en bacterias de origen clínico y ambiental (en aguas residuales municipales y de hospital) y, en ellos, la mayoría de casetes genéticos codificaban resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos (Correia y col., 2003; Tchuente y col., 2016), no encontrándose una gran diversidad de casetes, quizá por no ser tan activa la integrasa (Gillings, 2014). Precisamente, todas las cepas positivas para esta clase de integrones muestran un perfil de resistencia a betalactámicos y/o aminoglucósidos, que podrían potencialmente explicar estas resistencias. Además, en el caso de *Pseudomonas* spp., se han identificado integrones de clase 3 asociados a metalo-betalactamasas (Deng y col., 2015), estas

podrían ser las responsables del perfil de resistencia de *P. koreensis* 2132.2 ya que en los integrones de clase 1 y 2 se identificaron genes relativos a otro tipo de funciones (Tabla V.8).

Aun no existe un consenso sobre los cebadores a utilizar para caracterizar los integrones de esta clase; hasta la fecha se han caracterizado mediante secuenciación de nueva generación, clonación o diseño de cebadores específico para la cepa de estudio (Collis y col., 2002; Correia y col., 2003 Tchuente y col., 2016). Debido a esto, no se caracterizaron los integrones de clase 3 en el presente estudio; esta tarea sería de gran interés y proporcionaría un gran volumen de conocimiento sobre esta clase de EGM en futuros estudios. Sí se secuenciaron las integrasas de clase 3 de las cepas *Staphylococcus pasteurii* 62112.1 y 62112.5, con el objetivo de confirmar que el amplicon obtenido correspondía con la integrasa y no se trataba de una hibridación inespecífica. Tras analizar las secuencias y compararlas con la base de datos Gene Bank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), ambas resultaron tener un 91 – 92 % de identidad con la transposasa de la familia IS3 de *Mycobacterium avium* CP029333.1 (código de referencia del GeneBank).

Merece la pena recalcar que, casi la mitad (20 de 41, o sea el 49 %) de las BE positivas para la presencia de genes *intI* son positivas para la presencia de más de una clase de integrones y 11 (27 %) para la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3. De estas 11 cepas positivas para las tres clases de integrones estudiadas, 9 pertenecen al género *Bacillus*: las cepas de *B. clausii* de la AVL 1113, *B. licheniformis* 141.1, *B. altitudinis* 5512.14, multirresistentes, y la cepa *B. pumilus* 5521.11, resistente a higromicina, espectinomicina y eritromicina. El género *Bacillus* spp., como se indica en el Capítulo IV, se caracteriza por su metabolismo flexible y su capacidad de producir una variedad de enzimas y moléculas (de alto interés biotecnológico) que les permiten adaptarse a diferentes ambientes; esta adaptabilidad cabe esperar que la logren mediante la adquisición de diferentes genes que pueden acumular en integrones u otros EGM. Las restantes cepas que contienen integrones de las tres clases estudiadas son *P. koreensis* 2132.2, que muestra resistencia a betalactámicos, incluyendo cefalosporinas y monobactámicos, espectinomicina y macrólidos, y *S. pasteurii* 32.4, que muestra un perfil de resistencia extendida (a betalactámicos, diversos aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas, rifamicinas y lincosamidas), sugiriendo la acumulación de diferentes GRA en los integrones que porta. En otros estudios también se ha demostrado la capacidad de las bacterias para transportar varios integrones u otros EGM (Ndagi y col., 2020). En varias cepas, además, se detectó más de un amplicón para la misma clase de integron, lo que podría indicar que la propia bacteria contiene más de una secuencia de integrones de la misma clase y/o que no se amplificó la secuencia completa. Esto también podría deberse a hibridaciones inespecíficas en los procesos de PCR.

Llama la atención que ninguna de las BE presentes en la AVL 521 porta integrones, pese a ser casi todas multirresistentes. Sin embargo, en las BE de las otras AVL de esta misma estación de muestreo, se detectaron integrones de las tres clases estudiadas. Este fenómeno incita a sospechar que las AVL pueden tener un papel en la diseminación de integrones, lo cual se discute en el Apartado 4 del presente capítulo.

Se observan diferencias a nivel de género en la presencia de integrones de distintas clases. Mientras que en cepas de *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* se detectaron las tres clases de integrones, en cepas de *Kocuria*, *Pseudoxanthomonas* y *Pantoea*, se identificaron únicamente integrones de clase 1 y en cepas de *Micrococcus luteus*, de clase 3. Las cepas de *Microbacterium* presentaron integrones tanto de clase 1 como de 2 y la cepa de *Paenibacillus glucanolyticus*, de clase 2 y 3. En estudios previos se ha demostrado la presencia de integrones de clase 1 en *Pseudoxanthomonas mexicana* (Selvaraj y col., 2022), *Microbacterium*, *Kocuria* (Mitchell y col., 2023), *Staphylococcus* (Li y col., 2017) y *Pantoea agglomerans* (Aibiniu y col., 2012), integrones de clase 1 y 2 en *Bacillus* spp. (Byrne-Bailey y col., 2011) e integrones de las tres clases en *Pseudomonas* (Deng y col., 2015). Estudios metagenómicos también han detectado genes de integrones de clase 2 en hábitats agrícolas asociados con *Firmicutes*; miembros de este filo son precisamente *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* (Gillings, 2014). Por tanto, este es el primer estudio en el que se describe la presencia de integrones de clase 3 en *Bacillus*, *Staphylococcus* y *M. luteus*, así como integrones de clase 2 en *Microbacterium*.

Tabla V.7. Resultados del estudio fenotípico y genotípico de las bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos.

CÓDIGO	BACTERIA	PERFIL DE RESISTENCIAS	MR/MRX	ST ^R /SPC ^R	INTEGRONES
1111 34	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	BL AG MC QN	MR	ST ^R SPC ^R	Int1
1113 8	<i>Bacillus cereus</i>	BL AG MC AF SXT	MRX	SPC ^R	Int1, Int3
1113 7	<i>Bacillus clausii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R	Int1, Int2 , Int3
1113 9	<i>Bacillus clausii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R	Int1, Int2, Int3
1113 10	<i>Bacillus clausii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R	Int1, Int2 , Int3
1113 11	<i>Bacillus clausii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R	Int1, Int2, Int3
1113 12	<i>Bacillus clausii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R	Int1, Int2 , Int3
1113 13	<i>Bacillus clausii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R	Int2, Int3
1113 16	<i>Bacillus clausii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R	Int1, Int2, Int3
1113 17	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	BL AG MC AF TET	MRX	ST ^R SPC ^R	Int2, Int3
13 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BL AG MC	MR	SPC ^R	Int1
141 1	<i>Bacillus licheniformis</i>	BL AG MC	MR	ST ^R SPC ^R	Int1, Int2, Int3
142 1	<i>Micrococcus luteus</i>	BL AG QN	MR	ST ^R SPC ^R	Int3
142 2	<i>Bacillus licheniformis</i>	BL AG MC QN AF TET	MRX	ST ^R /ne	-
142 8	<i>Staphylococcus warneri</i>	BL AG	-	SPC ^R	Int1
211 1	<i>Microbacterium aborescens</i> *	BL AG QN SXT	MR	SPC ^R	Int1
211 2	<i>Microbacterium aborescens</i> *	BL AG SXT	MR	SPC ^R	Int1
211 3	<i>Microbacterium aborescens</i> *	BL AG SXT	MR	SPC ^R	Int1
211 4	<i>Microbacterium aborescens</i> *	BL AG SXT	MR	SPC ^R	Int1
211 5	<i>Microbacterium aborescens</i> *	BL AG QN SXT	MR	SPC ^R	Int1
2121 2	<i>Staphylococcus warneri</i>	AG	-	SPC ^R	Int1 , Int3
2121 3	<i>Staphylococcus warneri</i>	BL AG	-	SPC ^R	-

AF: anfenicoles; AG: aminoglucósidos; BL: betalactámicos; FQN: quinolonas y fluoroquinolonas; Int: integrón; LC: lincosamidas; MC: macrólidos; MR: cepa multirresistente; MRX: cepa con multirresistencia extendida; "ni": no identificada; "ne": no evaluado; QN: quinolonas; ^R: resistente; RF: rifamicinas; SPC: espectinomina; ST: estreptomicina; SXT: combinación de sulfadiazina y diaminopirimidina; TT: tetraciclinas; "-": resultado negativo; * *Microbacterium aborescens/imperiale*. En **negrita** se muestran los integrones que pudieron secuenciarse para su caracterización. El código de colores hace referencia a las familias de antibióticos.

Tabla V.7. Resultados del estudio fenotípico y genotípico de las bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos. *Continuación.*

CÓDIGO	BACTERIA	PERFIL DE RESISTENCIAS	MR/MRX	ST ^R /SPC ^R	INTEGRONES
2121 5	<i>Staphylococcus warneri</i>	BL AG MC TET	MR	SPC ^R	Int3
2121 7	ni		-	ST ^R SPC ^R	Int1
2121 10	<i>Staphylococcus warneri</i>	AG	-	SPC ^R	Int1
2121 20	<i>Staphylococcus warneri</i>	AG	-	SPC ^R	Int1
2121 21	<i>Staphylococcus warneri</i>	AG	-	SPC ^R	-
2121 22	<i>Pseudoxanthomonas indica</i>	AG	-	ST ^R SPC ^R	Int1
2132 2	<i>Pseudomonas koreensis</i>	BL	-	SPC ^R	Int1, Int2, Int3
2132 3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BL AG MC	MR	-	Int1
2132 5	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	AG QN	-	SPC ^R	-
2132 6	<i>Kocuria rhizophila</i>	BL QN	-	-/ne	Int1
2132 7	<i>Pantoea agglomerans</i>	AG MC QN	MR	SPC ^R	Int1
231 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BL AG MC	MR	SPC ^R	-
32 4	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	BL AG MC AF TT RF LC	MRX	ST ^R SPC ^R	Int1, Int2, Int3
35 1	<i>Bacillus licheniformis</i>	BL AG QN SXD	MR	-/ne	Int1, Int3
4412 1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	BL AG QN	MR	SPC ^R	Int1
521 2	<i>Staphylococcus equorum</i>	BL AG QN	MR	SPC ^R	-
521 3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BL AG MC	MR	ST ^R SPC ^R	-
521 6	<i>Kocuria rhizophila</i>	BL AG	-	ST ^R SPC ^R	-
521 7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BL AG MC QN SXD	MRX	SPC ^R	-
521 9	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	BL AG MC QN	MR	SPC ^R	-
522 10	<i>Micrococcus luteus</i>	BL AG MC QN	MR	SPC ^R	Int3
522 12	<i>Micrococcus luteus</i>	BL AG QN	MR	SPC ^R	-

AF: anfenicoles; AG: aminoglucósidos; BL: betalactámicos; FQN: quinolonas y fluoroquinolonas; Int: integrón; LC: lincosamidas; MC: macrólidos; MR: cepa multirresistente; MRX: cepa con multirresistencia extendida; "ni": no identificada; "ne": no evaluado; QN: quinolonas; ^R: resistente; RF: rifamicinas; SPC: espectinomina; ST: estreptomicina; SXD: combinación de sulfadiazina y diaminopirimidina; TT: tetraciclinas; "-": resultado negativo; * *Microbacterium arborescens/imperiale*. En **negrita** se muestran los integrones que pudieron secuenciarse para su caracterización. El código de colores hace referencia a las familias de antibióticos.

Tabla V.7. Resultados del estudio fenotípico y genotípico de las bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos. *Continuación.*

CÓDIGO	BACTERIA	PERFIL DE RESISTENCIAS	MR/MRX	ST ^R /SPC ^R	INTEGRONES
522 22	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	BL AG MC FQN AF TT RF	MRX	ST ^R SPC ^R	Int1, Int2
5511 7	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	BL AG MC QN TT RF	MRX	SPC ^R	-
5511 9	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	BL AG MC QN RF SXD	MRX	ST ^R SPC ^R	-
5511 10	<i>Bacillus niabensis</i>	BL AG MC	MR	ST ^R SPC ^R	Int1 , Int2
5511 11	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	BL AG MC FQN TT RF	MRX	ST ^R SPC ^R	Int1
5511 14	<i>Bacillus pumilus</i>	AG MC	-	-/ne	Int1, Int2
5512 1	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	BL AG MC QN	MR	ST ^R	Int1
5512 14	<i>Bacillus altitudinis</i>	BL AG MC	MR	-/ne	Int1, Int2, Int3
5521 11	<i>Bacillus pumilus</i>	AG MC	-	-/ne	Int1, Int2 , Int3
62112 1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R SPC ^R	Int1, Int3
62112 2	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	BL AG QN	MR	SPC ^R	Int1
62112 5	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	BL AG MC	MR	ST ^R SPC ^R	Int3
62112 8	<i>Staphylococcus equorum</i>	AG QN	-	ST ^R SPC ^R	Int1
62112 9	<i>Staphylococcus equorum</i>	BL AG QN	MR	SPC ^R	Int1
622 1	<i>Microbacterium arborescens</i>	BL AG QN SXD	MR	SPC ^R	-
643 1	<i>Staphylococcus warneri</i>	BL AG	-	SPC ^R	Int1, Int2
72 7	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	BL AG MC AF RF	MRX	ST ^R SPC ^R	Int1, Int3
72 11	<i>Paenibacillus lautus</i>	BL AG FQN	MR	SPC ^R	-

AF: anfenicoles; AG: aminoglucósidos; BL: betalactámicos; FQN: quinolonas y fluoroquinolonas; Int: integrón; LC: lincosamidas; MC: macrólidos; MR: cepa multirresistente; MRX: cepa con multirresistencia extendida; "ni": no identificada; "ne": no evaluado; QN: quinolonas; ^R: resistente; RF: rifamicinas; SPC: espectinomycin; ST: estreptomycin; SXD: combinación de sulfadiazina y diaminopirimidina; TT: tetraciclinas; "-": resultado negativo; * *Microbacterium arborescens/imperiale*. En **negrita** se muestran los integrones que pudieron secuenciarse para su caracterización. El código de colores hace referencia a las familias de antibióticos.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTEGRONES

Tras analizar las secuencias de los integrones de clase 1 y de clase 2 que pudieron secuenciarse y compararlas con la base de datos Gene Bank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), se muestran las proteínas putativas para las que codifican, así como el porcentaje de identidad a dichas proteínas y su organismo portador en la Tabla V.8. Adicionalmente, se muestra en dicha tabla si el gen putativo se encuentra flanqueado por secuencias que codifican para recombinasas o transposasas en el microorganismo de referencia.

En cepas de *Bacillus* spp. se detectan algunos genes que codifican para familias de **transportadores y bombas de eflujo**: transportador ABC dependiente de ATP y transportador de la superfamilia MFS. Dos cepas de *B. clausii* presentan en sus sendos integrones de clase 2 el casete genético que codifica para un transportador activo de antibióticos ABC, capaz de exportar o importar diferentes compuestos y, en este caso, antibióticos. De hecho, este transportador se ha visto asociado con resistencia a macrólidos y aminoglucósidos (Shirshikova y col., 2021). Estos transportadores son frecuentes en *Bacillus* spp. (Hassan y col., 2017) y, precisamente, en un estudio realizado recientemente en China, han detectado un transportador ABC codificados en un integron de clase 1 de una cepa de *Bacillus* sp. multirresistente ambiental (Hu y col., 2004). Vale la pena señalar que se ha comprobado que este tipo de bombas de eflujo son beneficiosas para la supervivencia y replicación de *Campylobacter jejuni* en el interior de *Acanthamoeba polyphaga* (Vieira y col., 2017), por lo que no se puede descartar esta potencial función en las cepas de *B. clausii* que lo contienen.

Por su parte, las cepas de *B. pumilus* 5511.14 y 5521.11 presentan un transportador de azúcares MFS en un integrón de clase 1. Esta familia de transportadores utiliza la energía del gradiente de protones o de sodio para mover diferentes sustratos: azúcares, antibióticos, neurotransmisores, aminoácidos, vitaminas, iones y otros compuestos pequeños (Kumawat y col., 2023; Wang y col., 2020). Estos transportadores se han detectado en cepas de *Bacillus* spp. otorgándoles resistencias a lincosamidas, fluoquinolonas, tetraciclinas, rifamicinas y aminoglucósidos (Hassan y col., 2017; Kumawat y col., 2023), por lo que podría ser responsable del perfil de resistencias de dichas bacterias.

Otras de las secuencias obtenidas a partir de los integrones de cepas de *Bacillus* spp. codifican para genes que también pueden estar involucrados en la **resistencia a antibióticos**, como la adenosil-L-metionin (SAM) metilasa, el citocromo C o el Trmk, detectados en las cepas *B. clausii* 1113.7 y 1113.10. En todos los casos, los microorganismos de referencia (encontrados al

comparar las secuencias) presentan el gen que codifica para el factor sigma de la ARN polimerasa RpoD de forma contigua a estos genes, el cual, está ligado precisamente a la expresión de genes adquiridos horizontalmente (Grosse y col., 2022). La enzima TrmK (ARNt adenina(22)-N(1)-metiltransferasa) cataliza la metilación del ARN de transferencia (ARNt) bacteriano. En *B. subtilis*, parece que esta metilación se lleva a cabo gracias a la donación del grupo metilo por una SAM metilasa, por lo que es comprensible su codificación contigua. La TrmK es una enzima esencial en *S. aureus* (Sweeney y col., 2022), pero no parece serlo en *B. subtilis* (Dégut y col., 2019). Este dato resulta interesante ya que recientemente se ha observado que, ante concentraciones subinhibitorias de aminoglucósidos, fluoroquinolonas, betalactámicos, anfenícoles o trimetoprim, se producen modificaciones (como metilaciones) de genes ARNt y ARN ribosómicos (ARNr) no esenciales como respuesta de adaptación (Babosan y col., 2022). Por tanto, es posible que la presencia de este gen en el integrón de clase 1 de *B. clausii* 1113.7 y 1113.10 esté ligada a la resistencia a aminoglucósidos y macrólidos que expresan. Respecto al citocromo C, los aminoglucósidos parecen tener efectos sobre esta molécula, inhibiendo su reducción (Yamabe, 1980), por lo que cabría pensar que este gen codificara para un citocromo C capaz de evitar la unión a aminoglucósidos y actuar como mecanismo de desviación de su efecto. Resulta interesante también resaltar que el citocromo C se ha relacionado con la infección **intracelular** de *Legionella pneumophila* (Yip y col., 2011), por lo que este gen podría estar involucrado en la capacidad de sobrevivir en el interior de amebas.

También se detectan genes que codifican para **enzimas** que pueden tener diversas funciones, como las amidasas, las glicosiltransferasas o glutaminasas. Precisamente se han detectado en cepas de *Bacillus* que, como ya se ha comentado (Capítulo IV), poseen un metabolismo muy versátil que les permite adaptarse a diversos ambientes. Cabría pensar que, igual que en ambientes contaminados este género bacteriano es capaz de producir enzimas degradadoras para proliferar (Su y col., 2023), en ambientes contaminados por antibióticos, produjera enzimas capaces de hidrolizarlos.

Las amidasas son enzimas relacionadas con una gran variedad de procesos: se han detectado como responsables de la hidrólisis de betalactámicos (Holt y Stewart, 1964) y, por tanto, capaces de otorgar resistencia a esta familia de antibióticos, con la metabolización de xenobióticos¹⁰ (Hodgson, 2010), que podría explicar la capacidad de las cepas de *Bacillus* de crecer en medios contaminados y biodegradar contaminantes, con la formación de biofilms (Morris y col., 2023) y con la síntesis de peptidoglicano de la pared celular (Vermassen y col., 2019). En este último

¹⁰ Xenobiótico: sustancia ajena al organismo o ecosistema, que puede tener efectos adversos en los seres vivos.

rol, también se han visto involucradas las glicosiltransferasas (Sauvage y Terrak, 2016), así como en la adherencia y autoagregación bacteriana, la formación de **biofilm** y la evasión del sistema inmunitario (Yaklovieva y Walvoort, 2020). También se han detectado glicosiltransferasas capaces de inactivar macrólidos (Bolam y col., 2007) y, en cepas de *B. subtilis*, toxinas fúngicas (Zhou y col., 2024). Por su parte, las glutaminasas son enzimas que juegan un papel fundamental en el metabolismo del nitrógeno y, concretamente en cepas de *Bacillus* spp., se han aislado glutaminasas que pertenecían a la superfamilia de betalactamasas serin-dependientes y a las proteínas de unión a penicilina (Irajie y col., 2016) que podrían estar relacionadas con la resistencia a betalactámicos detectada.

Otras enzimas detectadas en cepas de *Bacillus* spp., aunque con un rol diferente, son las monooxigenasas identificadas en *B. pumilus* de las AVL 5521 y 5511, bien de la familia SidA/lucD/PydA o de la familia ornitina monooxigenasa, en sus respectivos integrones de clase 1. Ambas familias de monooxigenasas se han detectado en cepas de *Bacillus* spp. asociadas con la captación de hierro (Hauptka y col., 2021). En *Pseudomonas* spp., a parte de la captación de hierro, estas enzimas están relacionadas con patogenicidad y se consideran un factor de virulencia (Rosy y col., 2022), por lo que este podría ser también un rol potencial en cepas de *Bacillus* spp.

Por último, una de las secuencias identificadas en este género bacteriano codifica para la familia de proteínas LCP (LytR-Cps2A-Psr) y otra codifica para una enzima multifuncional ARNt nucleotidil transferasa/2'3'-fosfodiesterasa cíclica/2' nucleotidasa/fosfatasa o enzima de adición de CCA. La familia de proteínas LCP juega un papel importante en la formación de la envoltura celular en bacterias gram positivas y, más concretamente en *Bacillus*. En este género bacteriano, el factor LytR regula la formación de biofilm, la formación de fimbrias¹¹, la expresión de exoproteínas (incluidas toxinas) y el “quorum sensing”¹². Además, tanto en este como en otros géneros, es un factor de regulación poco común que suele afectar a la expresión de factores de **virulencia** (Kawai y col., 2011; Nikolskaya y Galperin, 2002; Okkotsu y col., 2014; Rajei y col., 2022).

Por su parte, la enzima de adición de CCA, codificada por el gen *cca*, está involucrada en la maduración de los ARNt. Resulta de especial relevancia el hecho de que la mayoría de los

¹¹ Fimbrias: estructuras delgadas y filamentosas que sobresalen de la superficie celular. Tienen diversas funciones, como la adherencia a superficies, la colonización de hospedadores y la formación de biofilms.

¹² “Quorum sensing”: proceso de comunicación celular bacteriano (mediante la liberación y detección de señales químicas) para coordinar y regular comportamientos en función de la densidad poblacional, como la formación de biofilm, la producción de toxinas o la activación de la virulencia.

eucariotas tienen solo una copia del gen codificante para esta enzima, mientras que *Acanthamoeba* spp. tiene múltiples copias; la mayoría tienen cercanía filogenética con el gen codificante en otros eucariotas, pero se ha descubierto que una de esas copias es filogenéticamente cercana al homólogo en proteobacterias y se sospecha que la haya adquirido por transferencia genética horizontal (TGH) a partir de estas (Erber y col., 2020). Por tanto, encontrar una secuencia con un 99,5 % de identidad con el gen *cca* de *E. coli* (perteneciente al filo *Proteobacteria*) en un integron de una bacteria endocitobionte no perteneciente al filo *Proteobacteria*, hace sospechar su adquisición, bien de proteobacterias presentes en el interior de la misma AVL, no detectadas en el presente estudio, y/o de la propia ameba hospedadora mediante mecanismos de TGH.

En una de las cepas de *Microbacterium arborescens/imperiale* de la ameba 211, se pudieron secuenciar tres amplicones de integrones de clase 1. Entre las proteínas putativas, se encuentra una proteína de la familia de reguladores TetR, especialmente conocidas por su rol en la regulación de las bombas de eflujo de antibióticos en microorganismos productores de antimicrobianos (como *Streptomyces* y otras Actinobacterias, filo al que pertenece *Microbacterium*) y en la regulación de la **resistencia** a tetraciclina en microorganismos que no lo son. También están involucradas en el “**quorum sensing**” y otros aspectos fisiológicos bacterianos (Cuthbertson y Nodwell, 2013). Adicionalmente, se identificaron otras dos enzimas putativas en esta cepa de *M. arborescens/imperiale*. Por un lado, una oxidoreductasa dependiente de FAD, grupo amplio de enzimas involucradas en múltiples reacciones del metabolismo bacteriano (Trisolini y col., 2019). Cabe destacar que, recientemente, se ha aislado una cepa de *Microbacterium* spp. capaz de utilizar sulfonamidas como fuente de carbono gracias a una monooxigenasa dependiente de flavina (FAD) y una flavina reductasa, capaces de romper moléculas de sulfonamidas. Los genes codificantes estaban altamente conservados en una isla genómica compartida entre varias actinobacterias degradadoras de sulfonamidas, que, además, contienen el gen *sul1* codificado en la región conservada del integrón de clase 1 (Kim y col., 2019). Por otro lado, se identificó una oxidasa de aminas con cobre. Estas enzimas catalizan la oxidación de aminas, las cuales pueden estar presentes en algunos xenobióticos; esto les permite usar sustratos de amina como fuentes de carbono y nitrógeno (Interpro, 2024).

Por último, se secuenció un gran número de amplicones de la cepa *Pseudomonas koreensis* de la AVL 2132 que codifican para proteínas putativas de funciones variadas (siete amplicones corresponden a integrones de clase 1 y un octavo al integron de clase 2). Por un lado, se identificaron hidrolasas α - β , las cuales han demostrado ser capaces de metabolizar pesticidas y otorgar resistencia cruzada con otros xenobióticos y, entre ellos, antibióticos. En *Bacillus*, se ha

detectado este tipo de hidrolasas codificadas en plásmidos y confiriendo multirresistencia a cloranfenicol (Rangasamy y col., 2018), mientras que en *Pseudomonas* se ha asociado a la resistencia a quinolonas (Wullich y col., 2020). Por otro, se identificaron proteínas de la familia LrgB y CidA, que afectan a la formación de **biofilm**, estrés oxidativo, la supervivencia en fase estacionaria y la tolerancia a antibióticos (Sharma-Kuintel y col., 2009); proteínas con dominio GGDEF que, en *Pseudomonas* spp., regulan la formación y dispersión de biofilm (Gjermansen y col., 2006) y proteínas de la familia YdgA que, aunque no están completamente caracterizadas, parece que pueden estar asociadas con funciones de motilidad mediante **flagelos** (Uniprot, 2024). También se identificó una proteína putativa de la familia de reguladores LuxR, la cual, está involucrada en la expresión de genes relacionados con **virulencia** en *Pseudomonas* spp. (Sánchez-Jiménez y col., 2023).

Un caso curioso es la detección de la familia de deshidratasas MaoC, enzimas que juegan un papel importante en la ruta de la síntesis de ácidos grasos en bacterias. Estas enzimas tienen un rol importante en el género *Mycobacterium* spp., caracterizado por una pared celular rica en ácidos micólicos, lípidos que requieren hidrogenasas de la familia maoC para ser sintetizados. Precisamente la capa lipídica de *M. tuberculosis* juega un papel importante en su patogénesis, en su resistencia a antibióticos y en su capacidad para persistir intracelularmente y, expresamente, es necesaria para su proliferación en el interior de *Acanthamoeba* (Biswas y col., 2015; Halloum y col., 2016; Singh y col., 2022). Estudios previos han demostrado la abundancia de *Mycobacterium* spp. en el interior de AVL aisladas de la Cuenca del Ebro (García y col., 2013), por lo que podría darse el caso de que los genes codificantes para esta familia de proteínas los hubiera adquirido esta cepa de *P. koreensis* del interior de las AVL. De igual manera, es posible que la cepa de *Staphylococcus pasteurii* 62112.1 hubiera adquirido su integron de clase 3 de una cepa portadora de una integrasa similar a la de *Mycobacterium* sp.

Por último, se detectaron las proteínas putativas TonB y FusC. Los transportadores TonB son proteínas integradas en la membrana externa que permiten captar e introducir hierro en la bacteria. Esta ruta está facilitada por FusC, una proteína que, mediante análisis de secuencias, parece haber evolucionado de la proteína homóloga vegetal (Grinter y col., 2018). Precisamente, y como se comenta en el Capítulo IV, *P. koreensis* es una bacteria que se ha encontrado en asociación con plantas, por ello, no es de extrañar que se haya identificado en esta cepa una serie de proteínas relacionadas con estos organismos. Por un lado, sintetasas de péptidos no ribosomales que, en *Pseudomonas* spp., están involucradas en la biosíntesis de ciclopéptidos, la regulación de “quorum-sensing” y el desarrollo de raíces en plantas hospedadoras (González y col., 2017). Por otro lado, se identificó también un Efecto tipo III, esencial para la virulencia de

bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia* spp. (Büttner, 2016). Por tanto, parece que la cepa aquí estudiada, gracias a los factores de virulencia que porta en sus integrones, actuaría como **fitopatógena**.

Merece la pena señalar que, hasta donde la autora conoce, sólo los transportadores ABC detectados en *B. clausii* han sido previamente detectados en integrones (Hu y col., 2004). Por lo tanto, dado que no se ha logrado secuenciar y caracterizar completamente los integrones, es posible que alguna de las secuencias obtenidas corresponda a hibridaciones inespecíficas. Aun así, debido a las peculiaridades del presente estudio (bacterias ambientales, menos estudiadas que las clínicas, y aisladas del interior de amebas), es entendible la falta de información contrastable. No obstante, la mayoría de las proteínas putativas identificadas durante la caracterización de los integrones se encuentran flanqueadas por integrasas o transposasas en las bacterias de referencia y, por tanto, este podría ser también el caso de las secuencias obtenidas en este estudio. En consecuencia, realizar posteriores estudios que permitan caracterizaran por completo los integrones detectados, así como evaluar la presencia de otro tipo de EGM en estas mismas cepas, podría aportar un conocimiento significativo sobre la TGH y los EGM en cepas endocitobiontes ambientales.

Tabla V.8. Proteínas putativas para las que codifican los amplicones de los integrones secuenciados de las bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA), tras comparar las secuencias con la Base de Datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), y posibilidad de que la secuencia se encuentre flanqueada por integrones (Int) o transposones (Tn) en la bacteria de referencia.

INTEGRONES DE CLASE 1				
BERA (AVL)	LONG	PROTEÍNA PUTATIVA	BACTERIA E IDENTIDAD (%)	FLANQ
<i>B. clausii</i> (1113)	882	Citocromo c + TrmK	<i>Souchella clausii</i> (CP155470.1) 93,2 %	Tn
	558	Metiltransferasa dependiente de SAM	<i>S. clausii</i> (CP019985.1) 95,4 %	Tn
		TrmK	<i>S. clausii</i> (CP140150.1) 93,2 %	Int
	638	Amidasa	<i>S. clausii</i> (CP019985.1) 87,1 %	Tn
<i>M. arborescens</i> * (211)	682	Oxidoreductasa de nucleótido de piridina-disulfuro dependiente de FAD	<i>Paenibacillus</i> sp (CP150215.1) 93,6%	-
	759	Regulador transcripcional de la familia TetR	<i>Paenibacillus</i> sp (CP150209.1) 90,2 %	-
	679	Proteína con un dominio de amina oxidasa con cobre	<i>Paenibacillus</i> sp. (CP150269.1) 94,6 %	Int
<i>B. niabensis</i> (5511)	618	ARNt nucleotidiltransferasa fusionado/2',3' fosfodiesterasa cíclica/ 2' nucleotidasa/fosfatasa CCA	<i>Escherichia coli</i> (CP054345.1) 99,5 %	Int
<i>B. pumilus</i> (5511)	785	Transportador de azúcares de la familia MFS + Regulador transcripcional de la familia LytR	<i>Bacillus altitudinis</i> (CP038517.1) 88,4 %	Tn
		Transportador de azúcares de la familia MFS + Proteína de la familia LCP	<i>B. altitudinis</i> (CP049589.1) 88,4 %	Tn
	206	Glicosiltransferasa	<i>B. altitudinis</i> (CP145438.1) 97,4 %	Int
	333	Monooxigenasa de la familia SidA/IucD/PvdA	<i>B. altitudinis</i> (CP049589.1) 94,1 %	-
		Ornitina monooxigenasa	<i>B. altitudinis</i> (CP126086.1) 93,5 %	Tn
<i>B. pumilus</i> (5521)	788	Transportador de azúcares de la familia MFS + Regulador transcripcional de la familia LytR	<i>B. altitudinis</i> (CP038517.1) 88,7 %	Tn
		Transportador de azúcares de la familia MFS + Proteína de la familia LCP	<i>B. altitudinis</i> (CP049589.1) 88,7 %	Tn
	342	Monooxigenasa de la familia SidA/IucD/PvdA	<i>B. altitudinis</i> (CP101506.1) 99,1 %	Tn
		Ornitina monooxigenasa	<i>B. altitudinis</i> (CP049589.1) 98,4 %	Tn

AVL: ameba de vida libre hospedadora; Long: longitud de la secuencia evaluada en pares de bases; **M. arborescens/imperiale*.

Tabla V.8. Proteínas putativas para las que codifican los amplicones de los integrones secuenciados de las bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA), tras comparar las secuencias con la Base de Datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), y posibilidad de que la secuencia se encuentre flanqueada por integrones (Int) o transposones (Tn) en la bacteria de referencia. *Continuación.*

BERA (AVL)	LONG	PROTEÍNA PUTATIVA	BACTERIA E IDENTIDAD (%)	FLANQ
<i>P. koreensis</i> (2132)	706	Regulador transcripcional LuxR + Hidrolasa α - β	<i>P. atacamensis</i> (CP087167.1) 96,6 %	Tn
		Receptor TonB	<i>P. atacamensis</i> (CP087167.1) 96,3 %	-
	363	Proteína de la familia FUSC	<i>P. atacamensis</i> (CP087167.1) 98,6 %	Tn
	429	Proteína de la familia LrgB + Proteína de la familia CidA/LrgA + Deshidratasa de la familia MaoC	<i>P. atacamensis</i> (CP123909.1) 99,0 %	Int
	796	Sintetasa de péptidos no ribosomales o de poliketidos	<i>P. atacamensis</i> (CP087171.1) 86,6 %	Int
	438	Hidrolasa α - β	<i>Pseudomonas</i> sp. (CP117458.1) 87,5 %	Tn
	634	Efecto Tipo III	<i>P. atacamensis</i> (CP077081.1) 89,8 %	Tn
	1152	Proteína con un dominio GGDEF	<i>P. atacamensis</i> (CP070503.1) 92,6 %	Tn
INTEGRONES DE CLASE 2				
BERA (AVL)	LONG	PROTEÍNA PUTATIVA	BACTERIA E IDENTIDAD (%)	FLANQ
<i>B. clausii</i> (1113)	573	Transportador multi-antibiótico ABC	<i>S. clausii</i> (CP019985.1) 99,5 %	Tn
<i>B. pumilus</i> (5521)	323	Glutaminasa	<i>B. altitudinis</i> (CP011150.1) 96,8 %	Int
<i>P. koreensis</i> (2132)	606	Proteína de la familia YdgA	<i>P. atacamensis</i> (CP070503.1) 92,7 %	-

AVL: ameba de vida libre hospedadora; Long: longitud de la secuencia evaluada en pares de bases; **M. arborescens/imperiale*.

4. EL PAPEL DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE COMO RESERVORIO Y VECTOR DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

El gran consumo de antibióticos tanto en humanos como animales provoca que una gran parte de estos acaben en el medio ambiente y, en gran medida, en los ecosistemas acuáticos. La presencia de concentraciones subinhibitorias de estos antibióticos en matrices ambientales genera una presión selectiva que promueve la aparición de resistencias a antibióticos y su diseminación mediante mecanismos de transferencia genética horizontal (TGH) entre bacterias (Abbas y col., 2023; Pérez y col., 2022). Poco a poco, las bacterias resistentes a antibióticos (BRA) desplazan las poblaciones bacterianas y cada vez son mayores los porcentajes de bacterias multirresistentes en ambientes acuáticos naturales, llegándose a encontrar BRA en aguas alpinas, glaciares e incluso en la Antártida (Navarro y col., 2023; Scott y col., 2020). Ante esta situación, cabe esperar que las amebas de vida libre (AVL) depreden BRA.

Como se explica en el Capítulo IV, hay bacterias capaces de sobrevivir en el interior de las AVL y, dada la alta resistencia de estas ante condiciones adversas, las AVL pueden actuar como vectores de BRA, transportándolas y protegiéndolas de procesos de potabilización y desinfección y, por tanto, suponer un riesgo para las personas expuestas a estas aguas (García y col., 2013). Ante este panorama y con el objeto de profundizar en el conocimiento sobre este rol de las AVL, se evaluó la presencia de BRA en el interior de AVL aisladas a partir de aguas superficiales de ríos de la Cuenca del Ebro con presión ganadera.

Como manifiestan los resultados (Apartado V.1), todas las AVL evaluadas demostraron ser portadoras de bacterias capaces de crecer en presencia de antibióticos y, en todas las aguas superficiales evaluadas, se detectaron bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA). Como se debate en el Capítulo IV, las BE que portan las AVL en su interior han tenido que estar presentes en el ecosistema acuático del que provienen. Estas han podido adquirir las resistencias en el propio seno del río, como consecuencia de la presión ejercida por los antibióticos presentes en él, o adquirirlas en las zonas adyacentes (tentativamente las explotaciones ganaderas) y llegar al río mediante infiltración o escorrentía (Pérez y col., 2022; Sidrach-Cardona y col., 2014). Para valorar sendas opciones, se comparan los perfiles de resistencia de las BE extraídas de AVL (Tabla V.2) con los antibióticos y con las BRA presentes en el agua de las mismas estaciones de muestreo (EM.1-EM.7). Estos resultados fueron obtenidos por otros investigadores del Proyecto OUTBIOTICS a partir del mismo muestreo de aguas

ESTACIÓN	RÍO (MUNICIPIO)	ANTIBIÓTICOS				BACTERIAS RESISTENTES														
		Azitromicina	Enrofloxacin	Sulfadiazina	Trimetoprim	Penicilinas	Cefalosporinas	Carbapenems	Aztreonam	Inh. Betalact.	Aminoglucósidos	Quinolonas	Tetraciclinas	Cloranfenicol	Trim.-sulf.	Clindamicina	Colistina	Fosfomicina	Mupirocina	Vancomicina
EM.1	Segre (Torres de Segre)																			
EM.2	Noguera Ribagorzana (Corbins)																			
EM.3	Clamor Amarga (Zaidín)																			
EM.4	Cinca (Fraga)																			
EM.5	Alcanadre (Sariñena)																			
EM.6	Flumen (Albalatillo)																			
EM.7	Gállego (Zaragoza)																			

Figura V.1. Presencia de antibióticos y bacterias resistentes a antibióticos en las aguas superficiales de estudio (Moles, 2021; Pérez, 2021). El color rojo indica presencia, el color verde indica ausencia y el color amarillo indica ausencia en primavera de 2018, pero presencia en otoño de 2018. (EM: estación de muestreo; Inhib. Betalact.: inhibidor de betalactamasas; Trim.-sulf.: trimetoprim-sulfametoxazol).

superficiales, realizado en la primavera de 2018 (Moles, 2021; Pérez-Etayo, 2021), y se muestran en la Figura V.1.

Comparación de las bacterias resistentes a antibióticos dentro y fuera de las AVL

Pérez-Etayo (2021) estudió el perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias presentes, libres, en las aguas superficiales muestreadas también en este estudio. Para ello, aisló bacterias mediante medio selectivo con betalactámicos, eje temático de dicha tesis doctoral, y obtuvo bacterias resistentes en todas las estaciones de muestreo (EM.1 a EM.7), coincidiendo con los resultados del presente trabajo. Posteriormente, aisló un total de 10 cepas de interés clínico (pertenecientes a las especies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia fonticola* y *Klebsiella oxytoca*) a partir de todas las estaciones aquí evaluadas excepto la EM.2 (río Noguera Ribagorzana a su paso por Corbins) y, tras realizar antibiogramas, obtuvo los perfiles de resistencia que se muestran en la Figura V.1 junto con perfiles de multirresistencia en las estaciones EM.3 (río Clamor Amarga en Zaidín), EM.4 (río Cinca en Fraga) y EM.6 (río Flumen en Albalatillo). Como puede observarse, los resultados no coinciden con los obtenidos en el presente estudio: hay notorias diferencias en las resistencias y sensibilidades detectadas por familia de antibióticos y por estaciones de muestreo, así como en las multirresistencias. En comparación y, aunque han de tenerse en cuenta las subestimaciones de sendos trabajos (Pérez-Etayo se centra únicamente en determinadas bacterias de interés clínico y el presente estudio se centra en una selección de BE cultivables en condiciones aerobias y medio nutritivo), se detecta resistencia a un mayor número de familias de antibióticos y un mayor número de bacterias multirresistentes en las bacterias aisladas del interior de las amebas.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Carstens y col. (2014). En dicho estudio, se evaluó la resistencia de bacterias libres y del interior de AVL aisladas a partir de aguas subterráneas. Se detectó que las BE eran resistentes a un mayor número de antibióticos que las bacterias aisladas directamente del agua. Además, se obtuvieron diferencias en el perfil de resistencias, indicando que los fenotipos de resistencia a antibióticos están compartimentalizados. Sumado a esto, algunas de las BE pertenecientes a géneros distintos y aisladas de la misma estación de muestreo presentaban el mismo patrón de resistencia, lo cual también se observa en el presente estudio: las cepas *Paenibacillus glucanolyticus* y *Bacillus clausii* de la AVL 1113 comparten el perfil AMP^R OX^R H^R K^R ST^R AZ^R E^R, *B. clausii* y *B. cereus* de la misma ameba comparten el perfil AMP^R OX^R CRO^R H^R E^R, *Staphylococcus epidermidis* y *S. pasteurii* de la AVL 521 comparten el perfil AMP^R PEN^R H^R AZ^R E^R NA^R, *B. altitudinis* y *Microbacterium*

paraoxydans de la AVL 5512 comparten el perfil OX^R H^R E^R, *Micrococcus luteus* y *B. licheniformis* de la AVL 142 comparten el perfil OX^R H^R E^R y las bacterias de las AVL 2132, 521, 522 y 62112 muestran similitudes entre sí respecto al perfil de resistencias de aminoglucósidos (Tabla V.4). En el estudio de Carstens y col. (2014), observaron patrones de resistencia similares entre diferentes puntos de muestreo; de forma similar, en el presente estudio hay similitudes en el perfil de resistencias de cepas de *B. licheniformis*, *Microbacterium* spp., *Staphylococcus* spp. y *M. luteus* procedentes de diferentes estaciones. Todo esto lleva a pensar que, si bien el entorno puede contribuir, las AVL pueden influir en el perfil de resistencias de las BE de su interior.

Comparación de las BERA y la presencia de antibióticos en el seno del río

Moles (2021) evaluó la presencia de determinados antibióticos (sulfadiazina, enrofloxacin, trimetoprim y azitromicina) en las mismas estaciones de muestreo del presente estudio. Comparando los resultados (Figura V.1) y, aunque en dicho trabajo se evaluó solamente la presencia de antibióticos de algunas familias, se pueden observar diferencias llamativas. Según Moles (2021), en ninguno de los ríos estudiados se detectó la presencia de azitromicina. En contraste, en el presente trabajo se detectó resistencia a este antibiótico en BE aisladas de todos los ríos, excepto el Gállego (EM.7), aunque en este último sí se detectó resistencia a macrólidos. Esta discrepancia podría deberse a la presencia de otros macrólidos en el agua, como tilosina o tilmicosina, que podrían inducir resistencia cruzada con eritromicina y/o azitromicina y que se emplean en ganadería en España (European Commission, 1998; Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos, PRAN, 2023). Además, es posible que en las aguas se encuentren metabolitos o subproductos de macrólidos que mantengan la actividad antibiótica (Löffler y col., 2023). Por otro lado, la fluoroquinolona enrofloxacin se detectó en todos los ríos estudiados, excepto en el río Alcanadre (EM.5), donde sí se encontró en la campaña de otoño (segunda campaña). Sin embargo, la resistencia a fluoroquinolonas en el presente estudio fue muy baja, con sólo un 8% de las BE analizadas mostrando resistencia y aisladas de los ríos Segre (EM.1), Noguera Ribagorzana (EM.2), Alcanadre (EM.5) y Gállego (EM.7). La presencia simultánea de sulfadiazina y trimetoprim se detectó en los ríos Clamor Amarga (EM.3), Cinca (EM.6) y Gállego (solamente en otoño), mientras que la resistencia a esta combinación se observó en BE de los ríos Segre, Noguera Ribagorzana, Alcanadre, Flumen y Gállego (EM.1, EM.2, EM.5, EM.6 y EM.7, respectivamente).

Hay que tener en cuenta que no se ha estudiado la presencia de antibióticos de todas las familias evaluadas en el presente trabajo y que diversos factores pueden afectar a la concentración de antibióticos en las aguas, como su hidrosolubilidad, su capacidad de formar compuestos con otras moléculas o de absorción a sedimentos, su susceptibilidad a la degradación por fotólisis o su estabilidad térmica, entre otros (Pérez y col., 2022). Aun así, las disparidades encontradas sugieren que las resistencias de las BE provienen de un origen diferente al río y/o que el microecosistema intracelular de las amebas puede fomentar y afectar a la aparición, mantenimiento y diseminación de resistencias.

El papel de las AVL en la aparición y diseminación de resistencias a antibióticos

Strassmann y Shu (2017) propusieron que la presencia de antibiótico puede favorecer la entrada de bacterias a la ameba. Este hecho explicaría que, bacterias sensibles a los antibióticos presentes en el río se encontraran en el interior de las AVL (como es el caso de BE sensibles a fluoroquinolonas y la combinación de sulfametoxazol y trimetoprim). Así, el interior de las AVL se convertiría en un microecosistema que las BE podrían usar como refugio ante la hostilidad de ambientes con altas concentraciones de antibióticos, como sucede de manera creciente en los ríos. Entonces, ¿pueden aparecer resistencias en el interior de las AVL? Estudios realizados por Walochnik y col. (1999) propusieron que el ambiente intracelular de las amebas puede contribuir a aumentar la resistencia de las BE, lo cual, podría llevarse a cabo por diferentes vías.

Por un lado, Greub y Raoult (2004) propusieron que **en el interior de las AVL pueden encontrarse concentraciones subinhibitorias de antibióticos** al dejar pasar una pequeña parte de los antibióticos disueltos en el ambiente que les rodea o, incluso, al hidrolizar parte del antibiótico en su interior. Precisamente, se ha detectado que *Acanthamoeba castellanii* es capaz de producir enzimas que inactivan betalactámicos (Chen y col., 2020). Además, y como se comenta también el Capítulo IV, varias de las BE detectadas son capaces de producir compuestos con actividad antibiótica, por lo que estas podrían ejercer también cierta presión selectiva en el interior de las AVL. De cualquiera de estas formas, se puede crear un micro-ecosistema que proporciona un ambiente propicio para la aparición de resistencias que dependería de los antibióticos presentes en el hábitat de la ameba. La presencia de subpoblaciones de bacterias de la misma especie con diferentes rangos de sensibilidad/resistencia a un antibiótico en una misma AVL, corroborarían esta vía; un claro ejemplo son las cepas de *Staphylococcus warneri* de la AVL 2121 con su resistencia a gentamicina o las cepas de *Bacillus clausii* de la AVL 1113 con sus diferentes grados de sensibilidad a kanamicina y espectinomicina (Tablas V.3 y V.4).

Por otro lado, la **transferencia genética horizontal (TGH)** se ha identificado como un proceso que se ve favorecido en el ambiente intracelular de la ameba. Este intercambio genético tradicionalmente incluía procesos de conjugación (mediados por plásmidos y elementos conjugativos integrativos), transformación (captación de ADN extracelular) y transducción (mediados por bacteriófagos); recientemente, se han propuesto también mecanismos que involucran agentes de transferencia genética (vectores naturales), nanotubos y vesículas extracelulares o exosomas (Emamalipour y col., 2020).

Atendiendo a los resultados, la elevada tasa de integrones presentes en las BERA evaluadas demuestra la potencial capacidad de transferir información genética mediante mecanismos de TGH en el interior de las AVL. Por ejemplo, las cepas de *B. clausii* de la AVL 1113 podrían transferir los genes involucrados en resistencia a antibióticos (transportadores MFS y ABC) presentes en los integrones de clase 1 y 2 (Tabla V.8) a otras especies de *Bacillus* presentes en la misma AVL, como *B. cereus* (Hu y col., 2004; Zhai y col., 2022) e, incluso, a otras especies gram positivas (Agerso y col., 2002) como *Paenibacillus glucanolyticus*. Este fenómeno de transferir información genética a géneros distantes también se ha observado en *Staphylococcus* spp. (SEIMC, 2011). Incluso, se ha descubierto la posibilidad de transmitir plásmidos no conjugativos entre bacterias gram positivas y gram negativas mediante nanotubos que conectan los citoplasmas bacterianos (Dubey y Ben-Yehuda, 2011), lo cual abre un enorme abanico de posibilidades respecto a la TGH.

A diferencia de la creencia tradicional de que las bacterias intracelulares evolucionan reduciendo su genoma, se ha observado que los microorganismos capaces de vivir en el interior de las AVL tienden a presentar genomas de mayor tamaño, comparando con sus afines no intracelulares. La mayor diferencia se ha encontrado entre bacterias del orden *Legionellales*, que exhiben genomas casi el doble de grandes que sus parientes más cercanos. Esto también lo demuestran otras bacterias y virus endocitobiontes (Moliner y col., 2010). Precisamente, el elevado número de integrones detectados en las BE evaluadas proporciona evidencia de que sus genomas no sufren reducciones, sino todo lo contrario: acumulación de casetes genéticos. Inclusive, algunas BE acumulan varios integrones de la misma clase y de diferentes clases (Tabla V.7).

La presencia de un gran número de secuencias de inserción y genes relacionados con fagos (marcadores de TGH) en genomas de endocitobiontes es otra evidencia de que las amebas constituyen un lugar para el intercambio de ADN entre BE; de hecho, se han identificado mediante análisis filogenéticos varios casos de probable TGH entre cepas endocitobiontes de *Rickettsia bellii*, *L. pneumophila* y *Protochlamydia amoebophila* (Moliner y col., 2010). Además,

se ha observado que las BE tienen sistemas de secreción T4SS, que no sólo median la TGH, sino que también evitan la fusión de la bacteria con los lisosomas de las AVL (vía amebiana para digerir las bacterias ingeridas). Este sistema es común entre microorganismos endocitobiontes encontrados en el interior de AVL y parece ser adquirido de diferentes orígenes, demostrando que los genomas se adaptan a un estilo de vida común, intra-amebiano (Moliner y col., 2010).

En este sentido, resulta interesante comentar que, en cepas de *Mycobacterium*, bacteria comúnmente encontrada en el interior de AVL en ambientes naturales y, de hecho, en la cuenca del Ebro (García y col., 2013), se ha detectado la presencia de una proteína que les permite infectar y sobrevivir la vida intracelular en macrófagos. Se trata de una acetiltransferasa capaz de acetilar kanamicina y otorgar resistencia cruzada a otros aminoglucósidos (Sanz-García y col., 2019). Por tanto, dada la variedad de mecanismos de TGH factibles en el interior de las amebas y la frecuente resistencia a kanamicina entre las BE analizadas (Tabla V.4), puede sospecharse que las BE del estudio adquiriesen el gen que codifica dicha proteína. En esta misma línea, resulta interesante considerar que, mediante la caracterización de los integrones (Tabla V.8), se detectaron genes codificantes para una proteína especialmente relevante en *Mycobacterium* spp., la cual, le permite proliferar en el interior de las amebas (la deshidratasa de la familia MaoC). También se detectaron otras proteínas asociadas a la vida intracelular de *L. pneumophila* (citocromo C) y *Campylobacter jejuni* (transportador ABC), bacterias también frecuentes en el interior de las AVL (García y col., 2013; Moreno-Mesonero y col., 2020a). La detección de estos genes en integrones presentes en diferentes BE y AVL apunta a la adquisición de los mismos mediante mecanismos de TGH que, con alta probabilidad, han podido ocurrir en el interior de AVL, donde la presión selectiva intracelular podría forzar la adquisición de estos genes. Esta vía podría ser también la responsable de la adquisición de integrasas de clase 3 por parte de las cepas de *Staphylococcus pasteurii* 62112.1 y 62112.5, las cuales, muestran una elevada identidad (91 – 92 %) con las de una cepa de *Mycobacterium avium*.

Wang y Wu (2017) recientemente detectaron plásmidos en bacterias endocitobiontes en cuyas secuencias encontraron genes codificantes de transportadores ABC, respuesta a estrés, factores de virulencia, reguladores transcripcionales, hidrolasas relacionadas con la pared celular y proteínas del metabolismo del hierro. Estos resultados se asemejan mucho a los obtenidos en el presente trabajo (Tabla V.9), por lo que todos estos caracteres podrían tener un papel importante en la adaptación a la vida en el interior de las amebas y ser transferidos mediante mecanismos de TGH.

En el interior de las AVL también podrían ocurrir procesos de transformación, al incorporar ADN libre de bacterias digeridas en el interior de la ameba, y de transducción, al ser un ecosistema en el que frecuentemente se encuentran virus (Greub y Raoult, 2004; Wang y Wu, 2017). De hecho, cabría esperar la presencia de bacteriófagos en el interior de las AVL. Además, se ha sugerido que la ameba hospedadora puede desempeñar un rol activo en los intercambios genéticos (Carstens y col., 2014; Moliner y col., 2010). En este sentido, algunos estudios han demostrado que bacterias del género *Wolbachia* son capaces de transferir genes a sus hospedadores eucariotas y que los protozoos *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* pueden adquirir genes de procariotas por TGH (Moliner y col., 2010). Por tanto, cabría pensar que las BE podrían, por ejemplo, adquirir esas enzimas inactivadoras de betalactámicos que *A. castellanii* puede producir (Chen y col., 2020). De igual modo, resulta interesante sopesar que la higromicina es un antimicrobiano capaz de inhibir la síntesis de proteínas, no solo en bacterias, sino también en eucariotas, como hongos (Borovinskaya y col., 2008) y, posiblemente, amebas. Por tanto, es posible que las AVL sean capaces de desarrollar mecanismos de resistencia frente a este compuesto e, incluso, transmitírselo a las bacterias que contiene en su interior, lo cual podría explicar la elevada diseminación de resistencia a higromicina encontrada. En esta misma línea, la detección de la secuencia codificante para la enzima de adicción CCA en *Bacillus* (Tabla V.8) es de especial relevancia ya que, como se comenta en el Apartado 3, Erber y col. (2020) sugirieron con fuerte sustentación que *Acanthamoeba* spp. captó este gen de una proteobacteria mediante TGH.

Los resultados obtenidos corroboran el papel de las AVL como reservorio de resistencias a antibióticos y como “melting pot”¹³ idóneo para el intercambio no sólo de genes de resistencia a antibióticos, sino también factores de virulencia, promotores de la formación de biofilm y de supervivencia en el interior de macrófagos (Tabla V.9). De hecho, el interior de las AVL podría asemejarse a otros “melting pot” como son el suelo, granjas, la flora intestinal o las estaciones depuradoras de aguas residuales, ambientes en los que diferentes bacterias con diferentes genes de resistencia a antibióticos (GRA) interactúan, se multiplican e intercambian información genética mediante mecanismos de TGH (Moliner y col., 2010). Todo esto refuerza la importancia de realizar estudios de vigilancia microbiológica en ríos, como el llevado a cabo, así como revalorar las complicadas interacciones que tienen lugar en los ecosistemas naturales y evitar subestimar los mecanismos de los seres vivos para resistir y perdurar el impacto de las

¹³ “Melting pot”: comúnmente se traduce como crisol o foco de convergencia; esta traducción pierde el matiz original de un recipiente cerrado en el que se producen mezclas, por lo que se mantiene el término en inglés.

actividades humanas. Adicionalmente, en futuros estudios, sería de suma relevancia e interés secuenciar el genoma de las BE aquí estudiadas para comprender mejor los potenciales intercambios genéticos que tienen lugar en el interior de las AVL, así como comparar las BE con las bacterias aisladas directamente del medio en el que habiten las AVL y el propio genoma de las AVL.

Tabla V.9. Proteínas potenciales para las que codifican los amplicones secuenciados de los integrones (INT) tras comparar con la Base de Datos del NCBI.

PROTEÍNA PUTATIVA	BE (AVL)	INT	FUNCIÓN RELACIONADA CON							
			BF	FR	P	RA	QS	VI	V	Otros
Amidasa	<i>B. clausii</i> (1113)	Int1	X		X	X				
Citocromo C	<i>B. clausii</i> (1113)	Int1				X		X		
Transportador multi-antibiótico ABC	<i>B. clausii</i> (1113)	Int2				X		X		
TrmK + Metiltransferasa dependiente de SAM	<i>B. clausii</i> (1113)	Int1				X				
Glutaminasa	<i>B. pumilus</i> (5521)	Int2				X				Nitrógeno
Monooxigenasa	<i>B. pumilus</i> (5511 y 5521)	Int1							X	Hierro
Proteína LCP	<i>B. pumilus</i> (5511 y 5521)	Int1	X		X		X		X	Fimbrias
Regulador transcripcional LytR + Transportador MFS	<i>B. pumilus</i> (5511 y 5521)	Int1				X			X	
Enzima de adición de CCA	<i>B. niabensis</i> (5511)	Int1								ARNt
Glicosiltransferasa	<i>B. pumilus</i> (5511)	Int1	X		X	X				
Proteína con dominio amina oxidasa con cobre	<i>M. arborescens/imperiale</i> (211)	Int1								Aminas
Oxidorreductasa dependiente de FAD	<i>M. arborescens/imperiale</i> (211)	Int1				X				Metabolismo
Regulador transcripcional TetR	<i>M. arborescens/imperiale</i> (211)	Int1				X	X			
Deshidratasa MaoC	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1			X			X	X	Ácidos grasos
Efecto Tipo III	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1		X						
Hidrolasa α-β	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1				X				
Proteína con un dominio GGDEF	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1	X							
Proteína FUSC	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1		X						
Proteína LrgB + Proteína CidA/LrgA	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1	X			X				Estrés oxidativo
Proteína YdgA	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int2								Flagelos
Receptor TonB	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1								Hierro
Regulador transcripcional LuxR	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1							X	
Sintetasa de péptidos ribosomales o polikétidos	<i>P. koreensis</i> (2132)	Int1		X			X			

BF: biofilm; FR: relaciones fito-bióticas; P: pared; RA: Resistencia a antibióticos; QS: "quorum-sensing"; VI: vida intracelular; V: virulencia.

5. IMPACTO HUMANO EN LA DISEMINACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS DESDE LA PERSPECTIVA “ONE HEALTH”. RELEVANCIA Y RIESGOS ASOCIADOS

Influencia de la actividad ganadera en la resistencia de las bacterias endocitobiontes

En el presente estudio se evalúa la sensibilidad de las bacterias endocitobiontes (BE) a un extenso panel de aminoglucósidos con el objeto, entre otros, de valorar la influencia de la presión ganadera en la zona de muestreo. En la Figura V.2 se muestra el número de BE resistentes a cada aminoglucósido evaluado; destaca que el mayor número de resistencias detectadas corresponden a antibióticos de uso veterinario, como la higromicina y la espectinomina.

Aunque la higromicina ha dejado de usarse, fue empleada durante muchos años en ganadería porcina y avícola como promotor de crecimiento y control parasitario (McGaha y Champney, 2007). Actualmente, en España no está permitido su uso veterinario (CIMAvet, 2024), pero es posible que su utilización en el pasado haya influido en la diseminación de su resistencia y, pese a cesar su utilización, los mecanismos de resistencia adquiridos frente a este antibiótico no desaparecen, como se ha observado con la colistina y otros antibióticos (Enne y col., 2001; Manson y col., 2004; Sorum y col., 2006). La colistina es un antibiótico que se empleó durante muchos años como promotor de crecimiento animal, provocando la diseminación de genes de resistencia a este antibiótico en ambientes ganaderos, humanos y ambientales. Hoy en día, siguen apareciendo bacterias resistentes a colistina en países donde se prohibió su uso como promotor de crecimiento. Estudios evolutivos han demostrado que la resistencia puede mantenerse en poblaciones bacterianas no expuestas a antibióticos debido a la selección por mutaciones que compensan el coste de la resistencia, la denominada “adaptación por compensación”, o también por co-selección, al estar unidos estos a otros genes de resistencia, especialmente si forman parte de elementos genéticos móviles (EGM) como plásmidos o integrones (Ogunlana y col., 2022).

Por su parte, la espectinomina actualmente se emplea en España para tratar infecciones en ganado porcino, avícola, bovino y, recientemente, también cunícola (Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos, PRAN, 2023); por tanto, cabe pensar que la elevada tasa de BE resistentes a este antibiótico se deba al impacto de la alta presión ganadera adyacente a la zona de muestreo. Otros estudios también han detectado que el uso de espectinomina en

ganadería, especialmente porcina, está involucrado en la diseminación de genes de resistencia a este antibiótico (Soundararajan y col., 2023). La resistencia a espectinomicina puede además expresar resistencia cruzada con la estreptomicina, antibiótico empleado en veterinaria, en clínica humana y en la protección de cultivos agrícolas (Miller y col., 2022). El 43 % de las BE evaluadas presentan resistencia a este antibiótico, un porcentaje elevado que posiblemente tenga relación con la TGH, dado que son frecuentes los genes de resistencia a estreptomicina en integrones, como se discute en el Apartado 3 (Deng y col., 2015; Gillings, 2014).

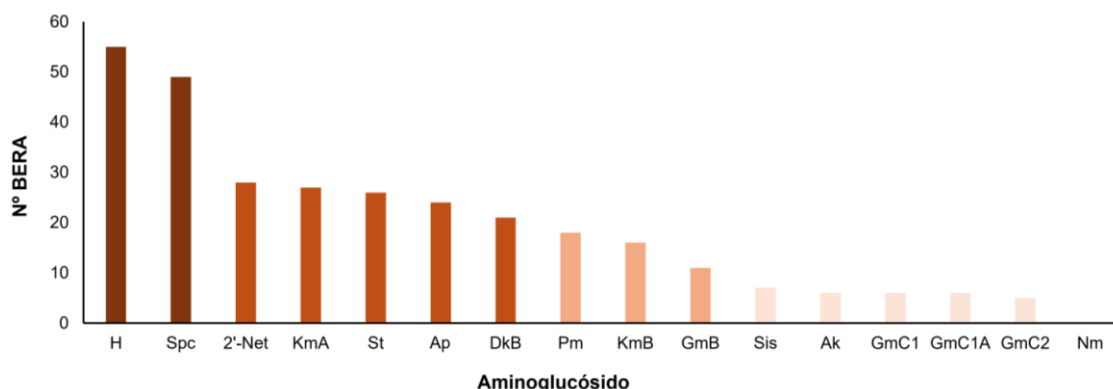


Figura V.2. Número de bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos (BERA) aminoglucósidos. (Ap: apramicina; Dk: dibekacina; Gm: gentamicina; H: higromicina; Km: kanamicina; Nm: neomicina; Pm: paromomicina; Sis: sisomicina; Spc: espectinomicina; St: estreptomicina; 2'Net: 2'-etil netilmicina).

La apramicina es otro antibiótico de uso exclusivo en veterinaria, particularmente utilizado en ganadería cunícola en España (PRAN, 2023). Inicialmente, su empleo para tratar disenterías causadas por *Escherichia coli* en el sector porcino provocó la aparición y diseminación de la acetilasa AAC(3')-IV, una enzima modificadora de aminoglucósidos (EMA) que presenta resistencia cruzada con gentamicina (Jensen y col., 2006). Pocos años después de la introducción de la apramicina en ganadería, se empezaron a detectar casos de infecciones humanas ocasionadas por *E. coli* resistente a gentamicina y apramicina, reforzando los conceptos de “One Health” al transmitirse las bacterias infecciosas de animales a humanos. Desde entonces se ha reducido su uso (Fresno y col., 2016). La resistencia en bacterias gram positivas no ha sido tan estudiada, pero parece que los genes de resistencia a apramicina en estas bacterias no expresan resistencia cruzada con otros antibióticos de interés clínico (Shaw y col., 1993). Aun así, la elevada tasa de resistencia a apramicina detectada en este estudio (41 % de las BE) corrobora el fuerte impacto que tienen las actividades ganaderas en la diseminación de resistencias en ecosistemas acuáticos adyacentes y sigue suponiendo un riesgo debido a su común transmisión en EGM (como plásmidos e integrones), los cuales pueden, a su vez, ir acompañados de otros casetes genéticos con genes de resistencia a antibióticos (GRA). De hecho, todas las bacterias

resistentes a apramicina demostraron ser también resistentes a otros aminoglucósidos y a antibióticos de otras familias (Tabla V.2).

Sorprende no encontrar bacterias resistentes a neomicina, ya que se trata de uno de los antibióticos más empleados en veterinaria (PRAN, 2023). La resistencia a neomicina suele implicar la expresión de fosfotransferasas que ofrecen resistencia cruzada con kanamicina, pero parece que la resistencia a kanamicina detectada en las BE se debe a mecanismos diferentes (Shaw y col., 1993). Otros estudios también demostraron bajas tasas de resistencia a este antibiótico en bacterias aisladas del sector avícola (Ripon y col., 2023). Esto puede deberse a que este antibiótico parece tener un gran poder de inhibición comparado con otros. De hecho, Jones y col. (2006) en un amplio estudio en el que evaluaron tanto bacterias gram positivas como negativas, detectaron que más del 80 % de las cepas resistentes a gentamicina (uno de los aminoglucósidos más inhibitorios del presente estudio) se mostraron sensibles a neomicina. Aun así, vale la pena señalar que la mayoría de los estudios sobre la resistencia a neomicina evalúan bacterias gram negativas, por tanto, este estudio puede suponer una interesante aportación al conocimiento de la resistencia en bacterias gram positivas ambientales.

Aunque no se detectaron explícitamente genes de resistencia a aminoglucósidos en el presente estudio, considerando su elevada frecuencia en integrones (Ramirez y Tolmasky, 2010), la alta tasa de BE positivas para la presencia de integrones (71 %, indicativa de impacto antropogénico) y la alta tasa de BE resistentes a aminoglucósidos de uso veterinario (98,5 %), además de que existen otros tipos de EGM no evaluados que pueden coexistir en una misma bacteria (como plásmidos, transposones y secuencias de inserción), sumado a que el 73 % de las cepas estudiadas presentan un índice MRA > 0,2 confirmando el impacto de la presión antibiótica, se puede concluir que la **actividad ganadera** de la zona estudiada **impacta en la resistencia de las BE de los ríos adyacentes y promueve la diseminación de BRA y GRA.**

Riesgos de las de bacterias endocitobiontes resistentes a antibióticos

En el presente trabajo, todas las BE aisladas de amebas son capaces de crecer en presencia de al menos un antibiótico y el 74 % de las BE identificadas presentan perfiles de multirresistencia. Esto supone un riesgo para la salud, tanto humana como animal, ante posibles infecciones por exposición a estas bacterias, lo cual, puede producirse gracias a la protección de las AVL a lo largo del curso y tratamientos del agua. Mayor aún es el riesgo considerando que el 73 % de las BE identificadas pertenecen a especies patógenas (*Staphylococcus warneri*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *Microbacterium paraoxydans*,

Micrococcus luteus, *Kokuria rhizophila*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *P. lautus*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas koreensis*).

Sin embargo, en términos de resistencia, las bacterias consideradas no patógenas hasta la fecha se vuelven también un riesgo ya que pueden transmitir mediante mecanismos de transferencia genética horizontal (TGH) genes que codifican para la resistencia de antibióticos (como transportadores ABC, MFS o reguladores TetR), factores de virulencia (como proteínas LCP o LuxR) y reguladores de la formación de biofilm (como proteínas CidA/LrgA y LrgB, proteínas con dominio GGDEF o glicosiltransferasas). Estos últimos son de especial importancia debido a que la capacidad de formar biofilm favorece la colonización de sistemas acuáticos artificiales y dificulta la erradicación microbiana pese a tratamientos de desinfección continuos (Thomas y col., 2010). Esta diseminación de genes la pueden lograr gracias a la recombinación mediante integrones, presentes en el 73 % de las BE evaluadas, y mediante otros EGM no evaluados en este trabajo y que, probablemente, estén presentes en dichas BE, como transposones o plásmidos. La presencia de estos integrones implica, además, no sólo esa capacidad de transferir genes, sino también de captar nuevos y acumularlos, convirtiendo a estas BE, patógenas o no, en potenciales reservorios de genes promotores de patogenicidad que, por ende, pueden suponer la aparición de nuevas cepas patógenas para animales y personas (Gillings, 2014).

En total, el 100 % de las AVL estudiadas es portadora de BE resistentes a antibióticos (BERA) y el 95 % (18 de 19) es portadora de BE multirresistentes, lo que agrava el riesgo asociado a estos microorganismos y subraya su fuerte papel como **reservorio de bacterias resistentes a antibióticos (BRA) y genes, de resistencia a antibióticos (GRA)**, y codificantes para otros **factores de patogenicidad**, como la capacidad de vivir intracelularmente. Esta habilidad, como se señala en el Capítulo IV, supone un riesgo para la salud humana y animal debido a la capacidad de evadir la depredación celular, lo cual favorece la supervivencia ante el ataque inmunitario de macrófagos (Guimaraes y col., 2016; Rayamajhee y col., 2022). Relativo a esta facultad, se encontraron varios genes en integrones de las BERA analizadas (como deshidratasa maoc, transportadores ABC o el citocromo C) relacionados con la proliferación y supervivencia intracelular y que, presumiblemente, se han adquirido en el interior de las amebas.

Riesgos e impacto desde la perspectiva “One Health”

El mal uso y abuso de los antibióticos, tanto en terapia humana como en actividades ganaderas y agrícolas, favorecen la diseminación de antibióticos en el medio ambiente (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2011). Los ambientes acuáticos se ven especialmente impactados por la descarga de aguas residuales que, pese a tratarse, no eliminan ni los antibióticos ni las BRA presentes (Pérez y col., 2022). En el sector ganadero, se emplean grandes volúmenes de antibióticos que, en un gran porcentaje, son excretados por los animales (Kumar y col., 2005). Frecuentemente, los purines y el estiércol de los animales, contaminados con antibióticos y BRA, se aplican sobre el suelo como fertilizante, provocando su llegada a los ecosistemas acuáticos colindantes a través de fenómenos de infiltración y escorrentía, los cuales también pueden arrastrar estos contaminantes del suelo de las instalaciones ganaderas. El aumento de las concentraciones de antibióticos en los diferentes biotopos (suelos, ríos, microbiota intestinal, microbiota amebiana) provoca la aparición y selección de BRA, así como su diseminación mediante mecanismos de TGH (Jia y col., 2017; Lei y col., 2024; Marutescu y col., 2022).

Como se muestra a lo largo del presente capítulo, las AVL se convierten en reservorios no sólo de bacterias potencialmente patógenas, como se refleja en el Capítulo IV, sino de BRA y GRA. El interior de las amebas se convierte en un micro-ecosistema en el que se fomenta la diseminación y el intercambio genético entre BE y, muy probablemente, entre las BE y la propia AVL, a la vez que se protege a estos microorganismos endocitobiontes de condiciones adversas. El resultado es una amalgama de bacterias (y seguramente virus y hongos) con una colección de factores de virulencia -y capacidad para adquirir más- que pueden sortear con facilidad los tratamientos de potabilización de agua gracias a la protección de la ameba y llegar a sistemas de distribución, desde donde pueden salir de la AVL y colonizar grifos, aires acondicionados, torres y sistemas de refrigeración, duchas, piscinas, redes acuáticas hospitalarias, sistemas de irrigación y, en general, todo tipo de instalación acuática (Cateau y col., 2014; Delafont y col., 2013; Thomas y col., 2008; Tovar, 2006). Desde estos puntos pueden entrar en contacto con personas y animales y, ya sea por su condición patogénica intrínseca o adquirida, ocasionar infecciones e incluso coinfecciones (de varias BE o de AVL + BE). Debido a la multirresistencia antibiótica de las BERA, favorecida por el impacto ganadero y la vida intra-amebiana, el tratamiento con antibióticos de primera línea (también llamados importantes) puede volverse insuficiente y requerir el uso de antibióticos de segunda línea (muy importantes o incluso críticos) que, si no se usan adecuadamente o si se produce un brote (como puede ocurrir con la BE *Legionella pneumophila*), puede provocar la aparición de nuevas resistencias, reincidiendo y retroalimentando el ciclo (OMS, 2018).

De esta forma, el rol de las AVL como **reservorio de BE potencialmente patógenas, BERA y genes de virulencia**, su rol como **vector de estos microorganismos**, diseminándolos en el medio ambiente ganadero y urbano, y su **rol protector** frente a condiciones adversas y sobre todo tratamientos de desinfección, convierten a las AVL en un foco que requiere mayor atención e investigaciones futuras. Además, considerando que las BE estudiadas en el presente trabajo son en muchos casos causantes de enfermedades nosocomiales, volviendo particularmente vulnerables a las personas inmunodeprimidas e ingresadas en ambientes hospitalarios, y frecuentes en el sector ganadero, donde podrían ocasionar también infecciones a los animales y a personas relacionadas con las actividades ganaderas, se reafirma y subraya la **necesidad de llevar a cabo más estudios de vigilancia ambiental de estos microorganismos**. Al fin y al cabo, hay una única salud y es necesario cuidarla, atenderla y vigilarla en sus tres esferas: humana, animal y ambiental.

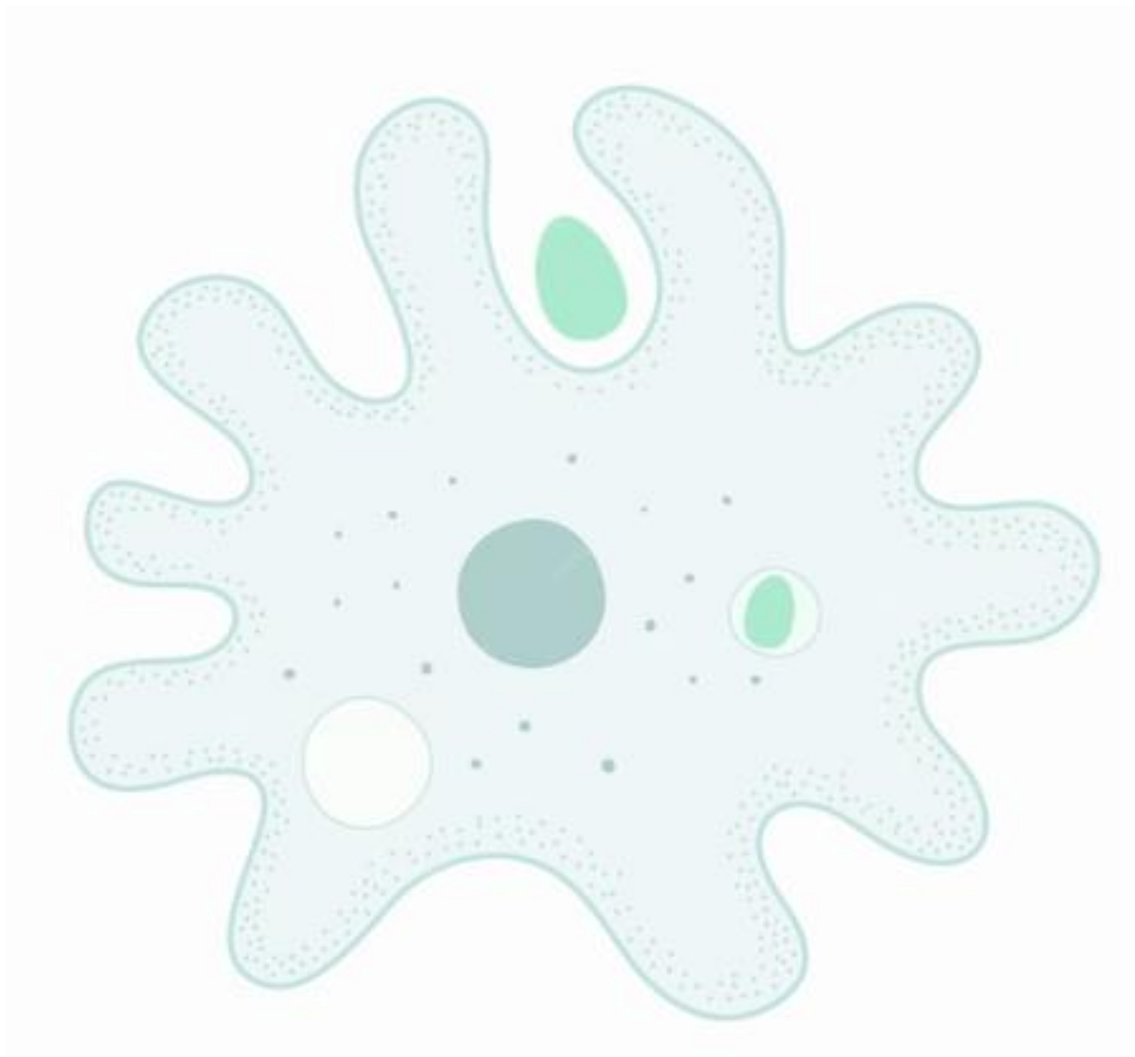
6. PRINCIPALES CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO V

A continuación, y en base a los objetivos planteados (Capítulo II), se muestran las conclusiones del presente capítulo:

- Se han detectado bacterias endocitobiontes capaces de crecer en presencia de al menos un antibiótico en todas las amebas de vida libre estudiadas. El 74 % de las BE evaluadas presentaron perfiles de multirresistencia, estando presentes en todas las aguas superficiales de la Cuenca del Ebro evaluadas y confirmando el papel de las amebas de vida libre como reservorio de bacterias resistentes a antibióticos.
- La resistencia a aminoglucósidos, seguida de betalactámicos y macrólidos fueron las encontradas en mayores proporciones. La resistencia a quinolonas se detectó en BE de todas las aguas superficiales de estudio, mientras que la resistencia a la asociación de sulfadiazina y diaminopirimidina, tetraciclinas, anfenicoles y rifamicinas, se detectó dependiente de la zona de muestreo y asociada a perfiles de multirresistencia.
- Se han obtenido elevadas tasas de BE resistentes a aminoglucósidos de uso veterinario: 95 % a higromicina, 89 % a espectinomicina, 35 % a estreptomycin y 30 % a apramicina, reflejo del impacto de las actividades ganaderas de la zona.
- El 71 % de las BE resistentes a antibióticos (BERA) son portadoras de integrones y el 86 % de las AVL transportan y protegen BERA con integrones. Se detecta la presencia de más de una clase de integron en 23 BERA (49 %) y, en 9 BERA (19 %), la presencia simultánea de integrones de clase 1, 2 y 3. Todas las muestras presentan BERA positivas para el integrón de clase 1, indicativo de contaminación antropogénica.
- Se han identificado genes que codifican proteínas involucradas en la resistencia a antibióticos, la formación de biofilm, virulencia, “quorum sensing”, motilidad, interacciones fito-bióticas y la vida intracelular al caracterizar los integrones de clase 1 y 2 presentes en BERA. Estos resultados sugieren el papel de las AVL como reservorio de genes de resistencia a antibióticos (GRA) y como potenciadores de la diseminación de GRA y otros factores de virulencia.
- Los perfiles de resistencia a aminoglucósidos, los elevados índices de multirresistencia y la elevada presencia de integrones de clase 1 sugieren el impacto de las actividades humanas en la resistencia a antibióticos de las bacterias endocitobiontes de la Cuenca del Ebro.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN RELATIVOS A LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DESINFECTANTES FRENTE AMEBAS DE VIDA LIBRE Y SUS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES



1. PUESTA EN MARCHA DE UN PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE AMEBAS DE VIDA LIBRE Y SUS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

Con el objeto de llevar a cabo la puesta a punto de un protocolo para la evaluación de la inactivación de amebas de vida libre (AVL) y sus bacterias endocitobiontes (BE), así como la evaluación de la efectividad de los desinfectantes, se lleva a cabo una revisión bibliográfica de las metodologías existentes. Posteriormente, se abordan consideraciones preliminares como la selección de cepas de estudio y la concentración inicial de las amebas y, finalmente, se valoran metodologías para determinar la supervivencia de las amebas y la de las bacterias tras la aplicación de agentes desinfectantes.

1.1. REVISIÓN DE METODOLOGÍAS EXISTENTES

Trabajar con amebas es bastante complicado todavía por la falta de metodología estandarizada. Algunos autores han descrito diferentes métodos, tanto para determinar la concentración de amebas de vida libre (AVL), como su viabilidad o su inactivación; entre ellos, se encuentran métodos cuantitativos, como el recuento mediante hemocitómetro o mediante la cámara de Fush Rosenthal tras teñir con azul tripán o azul Evans, o diferentes adaptaciones de la metodología del número más probable (Aksozek y col., 2002; Beattie y col., 2003; Chauque y Rott, 2021; Gabriel y Panaligan, 2020; Hamilton y col., 1977; Kolar y col., 2015; Thomas y col., 2008; Woyda-Ploszczyca y col., 2011). También se han descrito métodos cualitativos como determinar la viabilidad o ausencia de viabilidad tras los tratamientos, mientras que otros autores han desarrollado su propia metodología (Chauque y col., 2021; Chauque y Rott, 2021; King, 1988; Kolar y col. 2015; Maya y col., 2003).

Algunos autores, además, realizan pretratamientos variados de las muestras (Aksozek y col., 2002; Coulon y col., 2010; Gabriel y Panaligan, 2020; Heaselgrave y col., 2006; King, 1988; Kolar y col., 2015; Lonnen y col., 2005; Maya y col., 2003), mientras que otros los omiten (Dupuy y col., 2011, 2014; He y col., 2021). Tampoco existe homogeneidad en el tratamiento y expresión de los resultados, complicando la comparación de la efectividad de diferentes tratamientos de desinfección entre estudios.

En cuanto a las bacterias endocitobiontes (BE), se han llevado a cabo pocos estudios que evalúen la capacidad de inactivarlas y, de nuevo, no hay estandarización de la metodología de identificación y cuantificación. De hecho, hay una gran heterogeneidad en los protocolos para

la extracción de bacterias del interior de amebas: sonicación, congelación y descongelación rápida, Triton-X, centrifugación y vórtex o molienda con bolitas de zirconio, así como para determinar la supervivencia de las bacterias (Dupuy y col., 2011; García y col., 2007; He y col., 2021; Kilvington y col., 1990; King y col., 1988; Storey y col., 2004; Wang y col., 2023a). Algunos autores, además, comprueban la presencia y la viabilidad de las bacterias en el interior de las amebas de estudio mediante microscopía electrónica, la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés) o kits comerciales (He y col., 2021; Storey y col., 2004; Wang y col., 2023a).

Esta variedad metodológica complica el estudio de la eficiencia de diferentes tratamientos de desinfección frente a las bacterias protegidas en el interior de las amebas. Además, hasta la fecha, esas bacterias analizadas se introducen previamente en las amebas (amebas infectadas *in vitro*); nunca se ha evaluado el efecto de diferentes tratamientos de desinfección frente a las BE que las amebas portan de forma natural en su interior.

Por todo ello y con el objeto de poner a punto un protocolo para la evaluación de inactivación de cepas de AVL y sus BE, se lleva a cabo un conjunto de ensayos de *screening* o cribado en los que (1) se valoran diferentes métodos para determinar la supervivencia de las AVL y sus BE y (2) se establece el rango de dosis de los diferentes desinfectantes a estudiar.

1.2. CONSIDERACIONES PRELIMINARES

***Acanthamoeba* como modelo de estudio de amebas de vida libre**

La resistencia a los desinfectantes y, por ende, su efectividad, varía en gran medida en función del género de ameba estudiado, de la especie e, incluso, de la cepa. *Acanthamoeba* es el género más abundante y comúnmente aislado en muestras de agua, tanto natural como artificial (García y col., 2013; Mosteo y col., 2013). Es además un patógeno oportunista, causante de queratitis amebiana, daños pulmonares, lesiones cutáneas y hasta encefalitis amebiana granulomatosa (Goñi y col., 2014). Ha demostrado una gran resistencia a los desinfectantes y, de hecho, en estudios en los que se compara la efectividad de desinfección frente a diferentes géneros de AVL, *Acanthamoeba* ha resultado ser el más resistente a cloro, dióxido de cloro, monoclaramina (Dupuy y col., 2014) y desinfección solar (Heaselgrave y Kilvington, 2011). Cabe añadir que se han aislado una enorme variedad de especies bacterianas, hongos, levaduras y virus en el interior de cepas de *Acanthamoeba*. De hecho, según Goñi y col. (2014), el 20 % de las cepas de *Acanthamoeba* aisladas, tanto de muestras clínicas como ambientales, protegen bacterias en su

interior y, en muchas ocasiones, estas bacterias son potencialmente patógenas para la salud humana. Aunque atendiendo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, estos porcentajes pueden ser mucho mayores (Capítulo IV).

Además, se trata de un género de ameba fácilmente cultivable en el laboratorio en comparación con las restricciones y demandas de otros géneros como *Balamuthia* spp. o especies como *Naegleria fowleri* (Visvesvara y col., 2007). Por todo ello, se puede considerar *Acanthamoeba* como un género práctico y apropiado para emplearlo como modelo de estudio de las AVL y que, además, *a priori* evita subestimaciones del poder desinfectante de los tratamientos a estudiar.

Selección de cepas de estudio

La principal limitación a la hora de trabajar con amebas es el tiempo de incubación que requieren hasta alcanzar un crecimiento exponencial. Mientras que, para una gran mayoría de las bacterias, se puede observar fácilmente crecimiento en forma de colonias en placas de agar tras 24-48 horas, las amebas pueden tardar hasta un mes (o más) en proliferar tanto en medios de cultivo sólidos como líquidos y, de hecho, aún falta mucho desarrollo para poder cultivar en el laboratorio una mayor diversidad de géneros y especies de amebas. Por este motivo, las cepas seleccionadas para desarrollar un protocolo de desinfección son cepas capaces de proliferar en condiciones sencillas (agar no nutritivo cubierto con *Escherichia coli* inactivada) tras 7 días de incubación a 30 °C (Figura III.11).

Concretamente, las cepas seleccionadas provienen de orígenes distintos, lo cual, puede influir en su resistencia o sensibilidad a los tratamientos de desinfección. Por un lado, se estudia la *Acanthamoeba* P31, aislada de agua para uso recreacional en Zaragoza (Ortillés y col., 2017). Esta AVL habita en una piscina descubierta y, por tanto, ha superado el tratamiento de potabilización al que se somete el agua de captación, ha sobrevivido a lo largo del sistema de distribución de la red de abastecimiento urbana y constantemente está expuesta a tratamiento *in-situ* de cloración y radiación solar. Por otro lado, se estudia la *Acanthamoeba* sp. 211, aislada del río Noguera Ribagorzana en el muestreo de la primera campaña (como se describe en el Capítulo IV) y denominada de aquí en adelante como *Acanthamoeba* C1-211. Esta AVL ha podido estar en contacto con contaminantes o cambios en las condiciones ambientales. Además de estas diferencias, la microbiota que estas cepas de *Acanthamoeba* pueden contener en su interior y por tanto, las interrelaciones con ella, pueden variar también considerablemente. Cabe destacar que este es el primer estudio en el que se analiza la eficacia de diferentes

desinfectantes frente a las bacterias endocitobiontes propias de la microbiota de las amebas ambientales de estudio.

Volumen de los ensayos y concentración inicial de amebas

Definir tanto el volumen de la suspensión de trabajo que va a ser sometida a ensayos de desinfección, como la concentración inicial de las amebas a estudiar, resulta fundamental por su carácter limitante a la hora de determinar la eficacia del tratamiento. Cuanto mayor sea el volumen (mL) de los ensayos y/o su concentración, mayor número de células han de inocularse inicialmente y, aumentar el número de células a inocular, requiere cultivar previamente cantidades muy elevadas de medio líquido (PPYG, descrito en el Apartado III.1.2) con las cepas de estudio y durante un gran periodo de tiempo. Además, los cultivos axénicos de *Acanthamoeba*, una vez alcanzan la fase estacionaria de su curva de crecimiento, paralizan la proliferación y se enquistan (Wang y col., 2023b). Si se realizan subcultivos durante el crecimiento exponencial, pueden obtenerse cultivos en crecimiento exponencial también, pero si se realizan subcultivos una vez alcanzada la fase estacionaria, la población de amebas, que mayoritariamente estará constituida por quistes, se mantiene más o menos constante la población, dificultando la obtención de grandes cantidades de amebas para los estudios a realizar. Si además en los ensayos de desinfección se analizan diferentes tratamientos con sus réplicas y controles, sigue aumentando la demanda del número de células de *Acanthamoeba* necesarias para emplear en el estudio y, por tanto, el tiempo necesario, el material y el espacio para incubar las amebas de estudio.

Entendiendo que mayores volúmenes de trabajo reproducen mejor un proceso de desinfección, el límite de detección y, por tanto, la concentración inicial de la ameba va a estar limitada por la técnica de detección de la supervivencia de las *Acanthamoeba* de estudio y sus BE. Por ello, se valoran el recuento y el número más probable (NMP) como métodos para evaluar la supervivencia de *Acanthamoeba* y el método del NMP para evaluar la supervivencia de las BE.

1.3. VALORACIÓN DE LOS MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SUPERVIVENCIA DE *ACANTHAMOEBA*

Valoración del método de recuento

Para valorar el método de recuento mediante hemocitómetro tras tinción con azul de tripán (descrito en el Apartado III.1.4.1), se evalúa la reproducibilidad del método a diferentes concentraciones iniciales y la centrifugación como método de concentración (6000xg durante 10 minutos). En primer lugar, se realizan ocho medidas de una misma muestra preparada a una concentración aproximada de 10^4 células/mL y otra a 10^5 células/mL de la *Acanthamoeba* C1-211. Como la inactivación de las amebas en los ensayos de desinfección se expresa como reducción logarítmica, se calcula el logaritmo de los valores de concentración (células/mL) obtenidos y, a partir de estos, se calcula el coeficiente de variación (CV) del método. Los resultados se muestran en la Tabla VI.1. En la Figura VI.1 se observan quistes teñidos y no teñidos por el colorante azul tripán; la tonalidad rosácea del fondo de la imagen se debe al uso de un filtro azul para proteger la visión de las personas observadoras.

El CV del método de recuento en las condiciones estudiadas varía entre 2,7 % y 9,4 %, dependiendo del orden de magnitud de la concentración de la muestra (10^4 o 10^5 células/mL, respectivamente). En el caso de los recuentos realizados a partir de la muestra con una concentración en torno a 10^4 células/mL, se obtiene un recuento en el que no se observa ningún quiste ni trofozoíto, lo cual indica una concentración inferior a $2,5 \times 10^3$ células/mL (el límite de detección de la técnica) y, por tanto, una concentración inferior a 3,4 log. Esta medida afecta a la media, la desviación estándar y, por ende, al coeficiente de variación (CV) de la metodología.

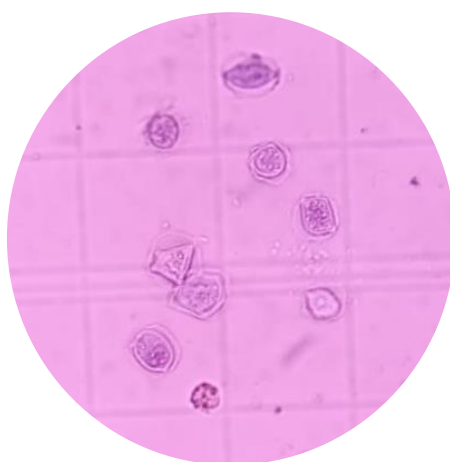


Figura VI.1. Quistes de la *Acanthamoeba* C1-211 tras tinción con azul tripán. Microscopía óptica (40x) con filtro azul.

Para evaluar la influencia del proceso de concentración de amebas mediante centrifugación previa al recuento, en la Tabla VI.2 se compara el CV del recuento por hemocitómetro de muestras con una concentración estimada de 2×10^4 células/mL, centrifugadas y sin centrifugar. Se puede observar que el centrifugado de la muestra permite la concentración de 6,5 veces el número de células a contar en promedio, comparando con el recuento directo.

Tabla VI.1. Coeficiente de variación (CV, %) del método de recuento mediante hemocitómetro tras tinción con azul tripán. Medidas realizadas a partir de dos muestras con diferente orden de magnitud de la concentración de amebas (C_i).

MEDIDA	$C_i = 10^4$ células/mL			$C_i = 10^5$ células/mL		
	células	células/mL	Log (células/ml)	células	células/mL	Log (células/ml)
1	3	$7,5 \times 10^3$	3,9	49	$1,2 \times 10^5$	5,1
2	3	$7,5 \times 10^3$	3,9	65	$1,6 \times 10^5$	5,2
3	3	$7,5 \times 10^3$	3,9	117	$2,9 \times 10^5$	5,5
4	2	$5,0 \times 10^3$	3,7	112	$2,8 \times 10^5$	5,5
5	1	$2,5 \times 10^3$	3,4	87	$2,2 \times 10^5$	5,3
6	5	$1,3 \times 10^3$	4,1	92	$2,3 \times 10^5$	5,4
7	0	$<2,5 \times 10^3$	$<3,4$	62	$1,6 \times 10^5$	5,2
8	3	$7,5 \times 10^3$	3,9	57	$1,4 \times 10^5$	5,2
\bar{X}	2,5	$6,3 \times 10^3$	3,8*	80,1	$2,0 \times 10^5$	5,3
S	1,5	$3,8 \times 10^3$	0,4*	25,7	$6,4 \times 10^4$	0,1
CV (%)			9,4*			2,7

*Se desconoce el valor real debido a la medida nº 7.

Tabla VI.2. Coeficiente de variación (CV, %) del método de recuento directo y recuento tras concentración mediante centrifugación.

MEDIDA	RECuento DIRECTO			RECuento TRAS CONCENTRACIÓN		
	células	células/mL	Log (células/ml)	células	células/mL	Log (células/ml)
1	10	$2,5 \times 10^4$	4,4	102	$2,6 \times 10^4$	4,4
2	18	$4,5 \times 10^4$	4,7	64	$1,6 \times 10^4$	4,2
3	13	$3,3 \times 10^4$	4,5	67	$1,7 \times 10^4$	4,2
4	13	$3,3 \times 10^4$	4,5	118	$3,0 \times 10^4$	4,5
5	12	$3,0 \times 10^4$	4,5	97	$2,4 \times 10^4$	4,4
6	16	$4,0 \times 10^4$	4,6	76	$1,9 \times 10^4$	4,3
7	9	$2,3 \times 10^4$	4,4	92	$2,3 \times 10^4$	4,4
8	13	$3,3 \times 10^4$	4,5	56	$1,4 \times 10^4$	4,2
\bar{X}	13	$3,3 \times 10^4$	4,5	84	$2,1 \times 10^4$	4,3
S	2,9	$7,3 \times 10^3$	0,1	21,6	$5,4 \times 10^3$	0,1
CV (%)			2,2			2,6

En la Figura VI.2 se compara la visión al microscopio de una muestra antes y después del proceso de concentración por centrifugado. Se puede observar que, al realizar el paso de concentración mediante centrifugación, se generan aglomeraciones y se concentran también restos celulares. En la Figura VI.3 se presentan observaciones realizadas mediante microscopía óptica (40x) tras tinción con azul de tripán que pueden generar confusión al realizar el recuento de quistes y trofozoítos.

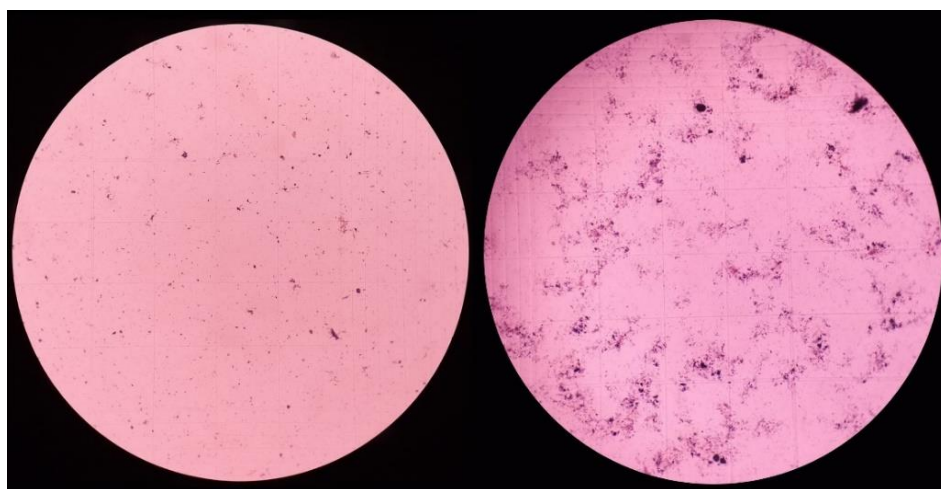


Figura VI.2. Alícuota tras 30 minutos de tratamiento con 50 mg/L de Cl_2 teñida con azul tripán. Observación directa (izquierda) y observación tras concentrado (derecha) mediante microscopía óptica (10x) con filtro azul.

Valoración del método del número más probable con *Acanthamoeba*

Para valorar el método del número más probable (NMP), se evalúa la reproducibilidad tras realizar ocho medidas de una misma muestra preparada a una concentración de 10^4 amebas/mL, siguiendo la metodología descrita en el Apartado III.1.4.2. Como la inactivación de las amebas en los ensayos de desinfección se va a expresar como reducción logarítmica, se calcula el logaritmo de los valores del NMP obtenidos y, a partir de estos, se calcula el coeficiente de variación del método. Los resultados se muestran en la Tabla VI.3. El CV del método del NMP en las condiciones estudiadas es 14,3 %.

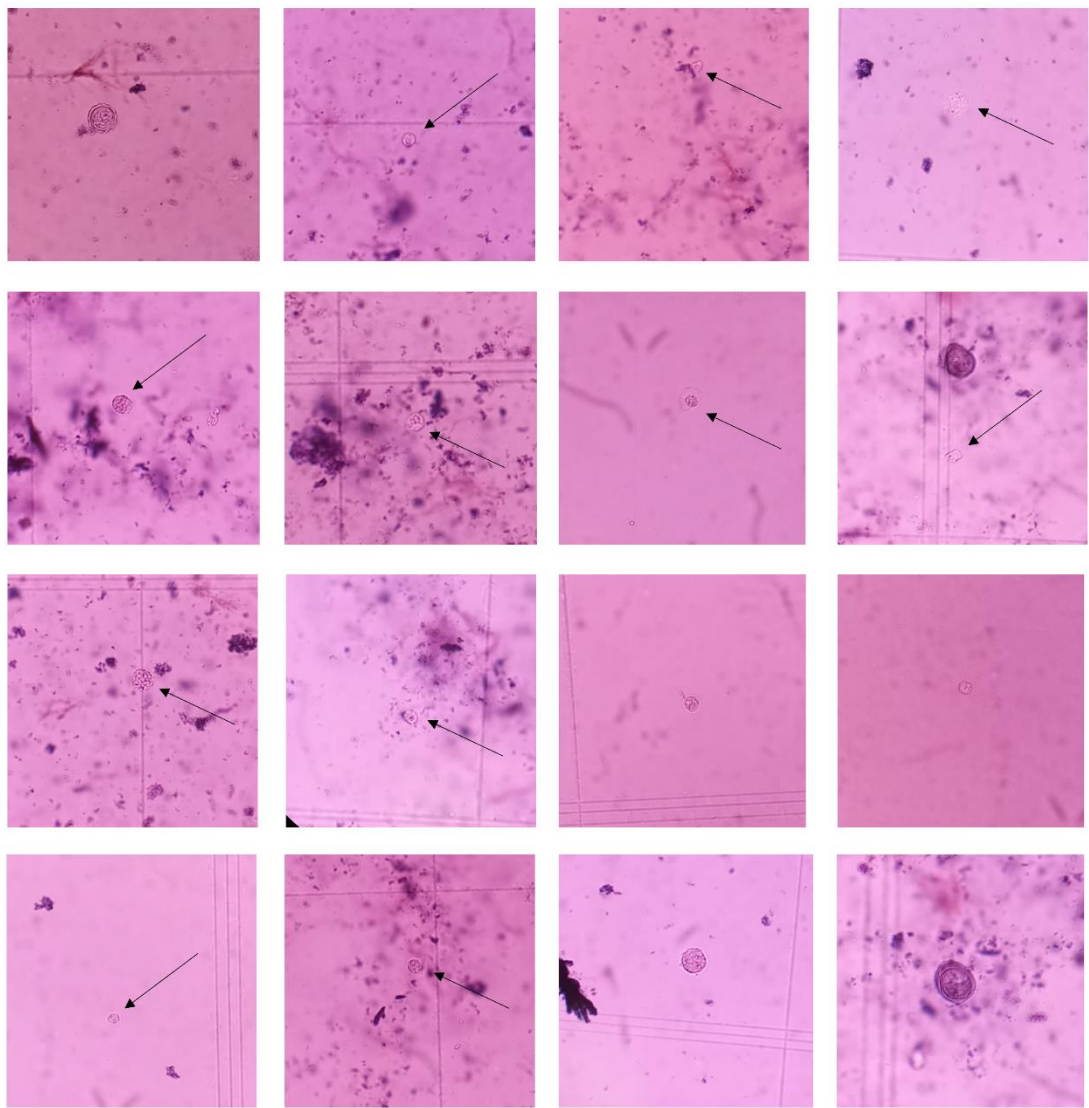


Figura VI.3. Observaciones por microscopía óptica (40x), con filtro azul, de recuentos de la *Acanthamoeba* C1-211 con azul de tripán.

Tabla VI.3. Coeficiente de variación (CV, en %) del método del número más probable (NMP).

MEDIDA	NMP	LOG (NMP)
1	2400	3,4
2	18000	4,3
3	1750	3,2
4	18000	4,3
5	2200	3,3
6	1400	3,1
7	1400	3,1
8	16000	4,2
\bar{X}		3,6
S		0,5
CV (%)		14,3

Ventajas y desventajas de los métodos para determinar la supervivencia de *Acanthamoeba*

Para seleccionar el método por el cual se evalúa la supervivencia de *Acanthamoeba* durante los ensayos de desinfección, previamente se analizan las ventajas y desventajas del método de recuento mediante hemocitómetro tras tinción con azul tripán y del método del número más probable (Tabla VI.4).

El recuento mediante hemocitómetro (detallado en el Apartado III.1.4.1) es una técnica basada en el recuento de células mediante microscopía óptica. Requiere poco material (un hemocitómetro y un microscopio óptico) y poco volumen de muestra (10 μ L). Además, puede realizarse directamente una vez tomada la muestra a analizar (tras el tiempo de incubación necesario para la tinción con azul tripán). Sin embargo, su desempeño está enormemente condicionado por la habilidad y experiencia de la persona encargada (Goñi y col., 2014).

En un cultivo axénico de *Acanthamoeba* en condiciones óptimas de crecimiento, los trofozoítos y quistes pueden distinguirse visualmente, tal y como se muestra en la Figura VI.4, pero al estar un prolongado tiempo en cultivos *in vitro*, se ha visto que *Acanthamoeba* puede disminuir su tamaño, perder los acantopodios y variar su morfología (Goñi y col., 2014) dificultando el recuento mediante hemocitómetro (Figura VI.5). Mediante el uso de colorantes como el azul tripán, pueden teñirse los quistes no viables para diferenciarlos de los viables. Sin embargo, las observaciones al microscopio muestran restos celulares y aglomeraciones que complican el recuento (Figura VI.3).

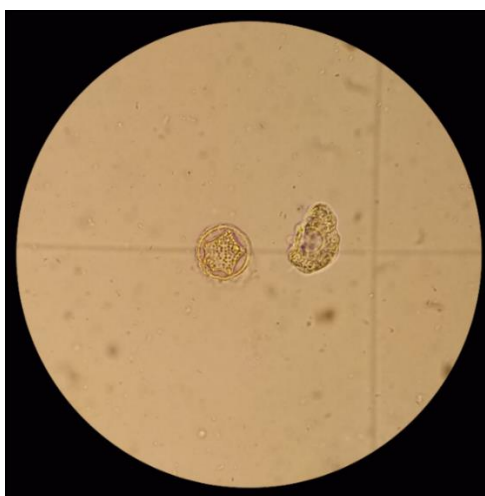


Figura VI.4. Trofozoíto (derecha) y quiste (izquierda) de la *Acanthamoeba* C1-211. Microscopía óptica (80x).

Otro factor a tener en cuenta es que el límite de detección de la técnica del recuento por hemocitómetro es de $1,25 \times 10^3$ células/mL. Considerando como un tratamiento efectivo aquel capaz de reducir al menos 3 unidades logarítmicas la población microbiana (Dupuy y col., 2011), la concentración inicial necesaria para realizar los ensayos de desinfección y determinar la supervivencia de las amebas de estudio mediante recuento, requeriría una concentración inicial de, al menos, $1,25 \times 10^6$ células/mL. La concentración mediante centrifugación podría reducir esta concentración inicial, pero, tal y como se ha observado, este proceso también concentra agregados que dificultan en gran medida el desarrollo del recuento (Figura VI.2).

Por su parte, el método del NMP tiene un límite de detección de 1 célula/mL. Tal y como se ha adaptado la metodología (Apartado III.1.4.2), se requeriría una concentración inicial de, al menos, 1×10^4 células/mL. Esta técnica permite por tanto reducir en gran medida el número de células que se han de inocular para el desarrollo de los ensayos de desinfección. Como desventajas, el método del NMP requiere un gran volumen de material y medio (cada muestra requiere, al menos, cuatro placas de ANN con *Escherichia coli*, además de largos períodos de incubación (entre 7 y 14 días para las cepas seleccionadas) y presenta un margen de error mayor al recuento.

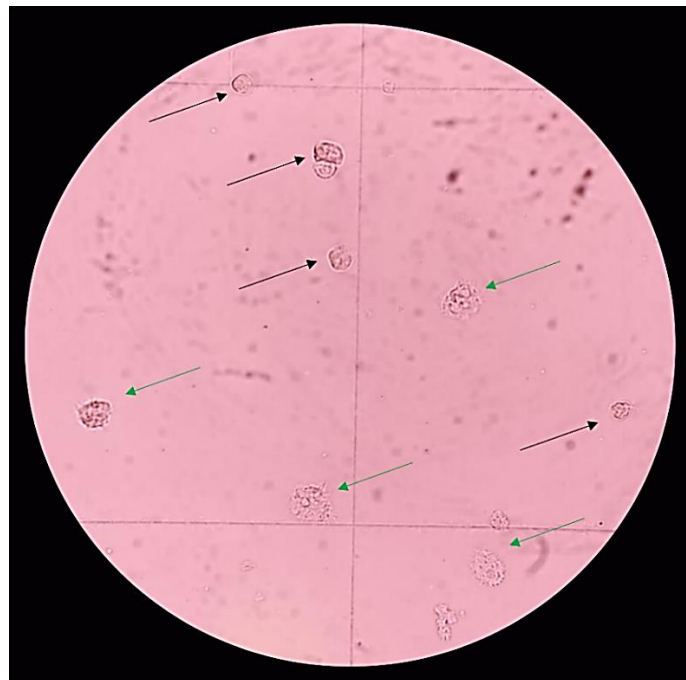


Figura VI.5. Trofozoítos con acantopodios (flechas verdes) y posibles trofozoítos o quistes (flechas negras) de la *Acanthamoeba* C1-211. Microscopía óptica (40x) con filtro azul.

Por otro lado, al realizar observaciones microscópicas con menor aumento (10x en vez de 40x con el recuento) es mucho más fácil determinar la viabilidad de la ameba (visualizar trofozoítos o caminos) y, de hecho, durante la evaluación de la supervivencia de las amebas en los ensayos de cribado, no se observan aglomeraciones o restos celulares que puedan interferir en los resultados. Es cierto que se puede subestimar la viabilidad de los quistes observados, ya que estos pueden corresponder a trofozoítos supervivientes que se enquistan antes de ser visualizados. Por ello, es necesario observar las placas en varias ocasiones a lo largo de los 7 días de incubación.

Tras realizar los ensayos de cribado y evaluar las ventajas y desventajas de las metodologías de recuento y el NMP (Tabla VI.4), se decide utilizar esta última para evaluar la supervivencia de las cepas de *Acanthamoeba* de estudio durante los ensayos de desinfección. Los ensayos se realizan en un volumen de 20 mL, la concentración inicial de amebas establecida es entre 1 y 2×10^4 células/mL y se toma el valor de la desviación estándar obtenido (0,5 unidades logarítmicas) como error de la técnica (Bosch, s.f.).

Tabla VI.4. Ventajas y desventajas de las técnicas de recuento y el número más probable (NMP).

RECuento	NMP
✓ Requiere poco material	✗ Requiere una elevada cantidad de material
✓ No requiere incubación	✗ Requiere un largo tiempo de incubación (mínimo 7 días)
✗ El límite de detección obliga a que la concentración inicial sea, al menos, 10^6 células/mL (posibilidad de concentrar mediante centrifugación, pero se generan aglomeraciones que dificultan la lectura)	✓ El límite de detección permite que la concentración inicial sea 10^4 células/mL
✗ Determina células totales, no distingue entre viables y no viables (posibilidad de teñir con azul de tripán, pero implica un tiempo de incubación de 1 – 24 h (según la casa comercial)	✓ Distingue entre amebas viables y no viables, aunque puede subestimarse la viabilidad de algunos quistes
✗ Proceso de observación difícil, requiere una gran experiencia	✓ Proceso de observación fácil

1.4. VALORACIÓN DE LOS MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SUPERVIVENCIA DE LAS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES

Pocos estudios han evaluado la capacidad de inactivación de desinfectantes frente a las bacterias protegidas por las amebas de vida libre (AVL) y, al igual que en el caso de estas, no hay estandarización de la metodología. Además, hasta la fecha, estos pocos estudios de desinfección evalúan la inactivación de las bacterias endocitobiontes (BE) que previamente han introducido, a concentraciones elevadas, en las amebas (AVL infectadas *in vitro*). Por ejemplo, Dupuy y col. (2011) infectaron *Acanthamoeba* con 10^4 células/mL de *Legionella pneumophila* y Wang y col. (2023a) infectaron *Dictyostelium discoideum* con 4×10^5 células/mL de *Burkholderia agricolaris*. Sin embargo, este es el primer estudio que evalúa la inactivación de las BE que albergan en su interior de forma natural dos cepas de *Acanthamoeba* ambientales. Estas amebas pueden transportar una gran variedad de géneros y especies bacterianas (y otros tipos de microorganismos), en diferente proporción, con diferentes necesidades nutritivas, diferentes condiciones de crecimiento e, incluso, que interrelacionan o compiten entre ellas. Además, pueden contener especies bacterianas no cultivables (Greub y Raoult, 2004).

Al haberse seleccionado la metodología del número más probable (NMP) para determinar la supervivencia de *Acanthamoeba*, se evalúa también la viabilidad de este método para la evaluación de la supervivencia de las BE. Para ello, se prepararon soluciones de ambas cepas de *Acanthamoeba* (C1-211 y P31) a una concentración estimada de 10^4 amebas/mL y se realizaron tres cuantificaciones de cada solución mediante el método del NMP. La metodología utilizada fue la misma que en el caso de las AVL (Apartado III.1.4.2), pero inoculando en agar Müeller Hinton e incubando las placas de Petri a 37 °C durante 48 horas. Las alícuotas positivas de las diferentes diluciones (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} y “total kill” o “TK”) se muestran en la Tabla VI.5.

Atendiendo a los resultados obtenidos, ambas amebas portan en su interior BE capaces de lisarla y salir de ella en las condiciones estudiadas. No obstante, comparando con la *Acanthamoeba* C1-211, la cepa *Acanthamoeba* P31 transporta en su interior una menor concentración de BE cultivables mediante estas condiciones ya que, en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} no crece ninguna BE. Esto impide utilizar el método del NMP para determinar la supervivencia de las BE. Sin embargo, las inoculaciones “TK” son de un volumen mayor que las inoculaciones de las diluciones (100 µL en vez de 10 µL) y, en el 100 % de las réplicas evaluadas y en ambas cepas de *Acanthamoeba*, se obtiene crecimiento bacteriano positivo, por tanto, este volumen y número de inoculaciones puede servir como control para los ensayos de desinfección. Posteriormente, se realizan inoculaciones de 100 µL a partir de diferentes concentraciones de ameba y el número de

inoculaciones positivas disminuye conforme disminuye la concentración de AVL iniciales. Esto permite establecer categorías cualitativas relativas a la inactivación de las BE: no hay inactivación, cuando el número de inoculaciones positivas coincide con el de las muestras control, inactivación parcial, cuando el número de inoculaciones positivas es menor que el de las muestras control, e inactivación total, cuando no crece ninguna BE. De esta forma, este “análisis cualitativo” se establece como método para determinar la supervivencia e inactivación de las BE cultivables en los diferentes tratamientos. Además, la valoración como inoculación con crecimiento positivo o negativo es sencilla, facilitando la tarea.

Tabla VI.5. Número de alícuotas con crecimiento bacteriano positivo en medio Müller Hinton, tras 48 horas de incubación a 37 °C, durante la evaluación del número más probable como método para determinar la supervivencia de bacterias endocitobiontes. Se emplean controles a una concentración inicial de 10^4 amebas/mL.

MEDIDA	C1-211				P31			
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	TK	10^0	10^{-1}	10^{-2}	TK
1	3	3	1	5	1	0	0	5
2	3	3	3	5	0	0	0	5
3	5	5	5	5	2	0	0	5

TK: “total kill” o inactivación total.

1.5. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE DOSIS DE DESINFECTANTE

Se realizan ensayos de cribado o *screening* para conocer el rango de dosis de cada desinfectante a estudiar (concentración de Cl_2 y H_2O_2 , tiempo de exposición de $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$) sobre la cepa *Acanthamoeba* C1-211 y sus BE. Partiendo de datos bibliográficos, los rangos de trabajo se van ajustando en función de los resultados que se van obteniendo. Los ensayos se realizan siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 4.3 del Capítulo III y evaluando la viabilidad de las AVL y de sus BE de forma cualitativa para facilitar y agilizar este proceso. Para ello, una vez tomadas las muestras al inicio y al final de los tratamientos (y a lo largo de los mismos en los tratamientos con radiación solar), se inoculan dos alícuotas de 10 μL de la muestra problema sobre una placa de medio de cultivo sólido (agar no nutritivo con *E. coli* inactivada o agar MH) y se valora la presencia o ausencia de crecimiento tras su incubación (7 días a 30 °C o 2 días a 37 °C), tal y como se indica en los Apartados 1.4.2 y 4.3.3 del Capítulo III para las AVL y BE, respectivamente. En la Figura VI.6 se muestra un ejemplo de la evaluación de la viabilidad de BE durante este proceso. Estos ensayos se realizan por triplicado.

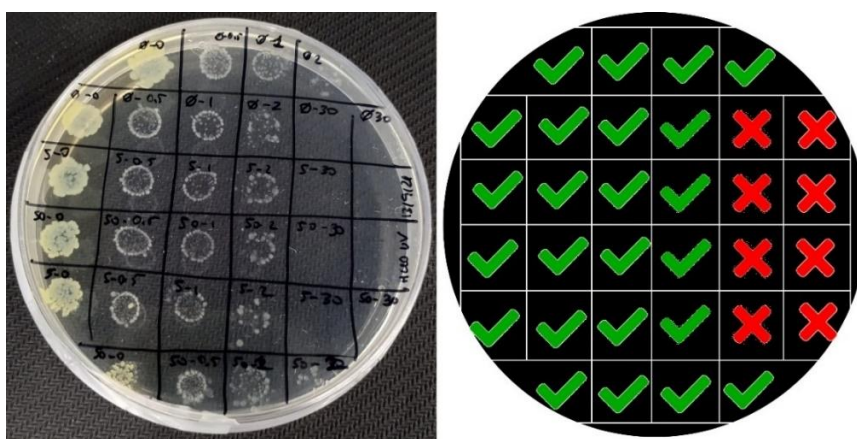


Figura VI.6. Placa de Müeller Hinton inoculada tras 24 h de incubación a 37 °C (izquierda) y cuadrícula de supervivencia de la placa (derecha). Las inoculaciones con crecimiento bacteriano (señaladas con un *tick* verde a la derecha) indican supervivencia de las bacterias y las inoculaciones sin crecimiento bacteriano (señaladas con una cruz roja a la derecha) indican no supervivencia de las bacterias.

Determinación del rango de dosis de hipoclorito sódico

Con el objeto de establecer el rango de dosis de hipoclorito sódico a evaluar en los ensayos de desinfección, se llevan a cabo tratamientos de 30 minutos a concentraciones de cloro que varían desde 1 a 1000 mg/L basándose en que: (1) la dosis de cloro empleada habitualmente en potabilización, que responde a la demanda de cloro del agua a potabilizar, suele estar comprendida entre 1 y 5 mg/L (Wang y col., 2023a), aunque puede ser superior, (2) se ha

descrito a *Acanthamoeba* como un género de AVL especialmente resistente al cloro (Thomas, 2013), reportando cepas capaces de sobrevivir a concentraciones de 500 mg/L o superiores (Gabriel y Panaligan, 2020) y (3) la guía de calidad de agua potable de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022) recomienda un tiempo de exposición de 30 minutos para los tratamientos de cloración. Los resultados de las tres réplicas de los ensayos de cribado se presentan en la Tabla VI.6. A partir de los resultados obtenidos, se establece como rango de concentraciones de estudio para los ensayos de desinfección con cloro: de 1 a 500 mg/L de Cl_2 .

Tabla VI.6. Supervivencia de la *Acanthamoeba* C1-211 (AVL) y sus bacterias endocitobiontes (BE) en los ensayos de cribado de cloración (5 mg/L a 1000 mg/L de Cl_2) tras 30 minutos.

[Cl_2] (Mg/L)	SUPERVIVENCIA	
	AVL	BE
0	+++	+++
5	+++	+++
10	+++	+++
25	+ - +	+++
50	+ - +	+++
100	- + +	++ -
500	- - -	- - -
1000	- - -	- - -

El símbolo más (+) indica supervivencia y el símbolo menos (-) indica no supervivencia de cada réplica realizada.

Determinación del rango de dosis de peróxido de hidrógeno

Con el objeto de establecer el rango de dosis de peróxido de hidrógeno a evaluar en los ensayos de desinfección, se llevan a cabo tratamientos de 30 minutos a concentraciones de peróxido de hidrógeno que varían desde 1,5 % a 7,5 % (m/V) basándose en que: (1) el tiempo de trabajo sea el mismo que en los ensayos de cloración y (2) se ha descrito el peróxido de hidrógeno especialmente eficaz frente *Acanthamoeba* para emplearlo como desinfectante en los líquidos de lentes de contacto, donde suelen emplearse concentraciones entre 3,5 y 7 % (muchos estudios no especifican si estos porcentajes corresponden a m/v o v/v), las cuales han demostrado diferente grado de eficacia dependiendo de la cepa de *Acanthamoeba* analizada (Coulon y col., 2010; Thomas, 2013).

Los resultados obtenidos a partir de esta batería de ensayos de cribado se presentan en la Tabla VI.7 y muestran que ni la *Acanthamoeba* C1-211 ni sus BE sobreviven a las concentraciones estudiadas en ninguna de las tres réplicas. Por ello, se realiza una segunda batería de ensayos de cribado a concentraciones de peróxido que varían desde 0,04 mM (0,0001 %, m/V) a 400 mM (1,36 %, m/V), basándose en estudios previos en que se utiliza 0,04 mM de H_2O_2 como

concentración de trabajo para evaluar la efectividad de la combinación de H₂O₂ y RS frente a *Enterococcus* y *Clostridium perfringens* (Lanao, 2012). Los resultados de las tres réplicas de los ensayos de cribado se presentan en la Tabla VI.8. A partir de estos resultados, se establece el siguiente rango de concentraciones de estudio para los ensayos de desinfección con peróxido de hidrógeno: de 1 a 40 mM.

Tabla VI.7. Supervivencia de la *Acanthamoeba* C1-211 (AVL) y sus bacterias endocitobiontes (BE) en los ensayos de cribado de peroxidación (1,5 % a 7,5 % de H₂O₂) tras 30 minutos de tratamiento

[H ₂ O ₂] (% m/v)	SUPERVIVENCIA	
	AVL	BE
0	+ - +	+ + +
1,5	- - -	- - -
3,75	- - -	- - -
7,5	- - -	- - -

El símbolo más (+) indica supervivencia y el símbolo menos (-) indica no supervivencia de cada réplica realizada.

Tabla VI.8. Supervivencia de la *Acanthamoeba* C1-211 (AVL) y sus bacterias endocitobiontes (BE) en los ensayos de cribado de peroxidación (0,04 mM a 400 mM de H₂O₂) tras 30 minutos de tratamiento.

[H ₂ O ₂] (% m/v)	SUPERVIVENCIA	
	AVL	BE
0	+ + +	+ + +
0,04	+ + +	+ + +
0,4	+ + +	+ + +
1	+ + -	+ + +
2	+ + -	+ + +
4	+ + -	+ + +
5	+ - -	+ + +
10	- - -	+ + -
20	- - -	+ + -
30	- - -	+ + -
40	- - -	+ - -
400	- - -	- - -

El símbolo más (+) indica supervivencia y el símbolo menos (-) indica no supervivencia de cada réplica realizada.

Determinación del rango de dosis de radiación solar

Con el objeto de establecer el rango de dosis de radiación solar a evaluar en los ensayos de desinfección, se llevan a cabo tratamientos de RS_{280-800 nm} en los que se toman muestras cada 15 minutos hasta los 120 minutos basándose en que: (1) estudios previos realizados por el grupo de investigación de Agua y Salud Ambiental demostraron que la combinación de 500 W/m² de RS_{280-800 nm} y 0,04 mM de H₂O₂ durante 30 minutos no fue suficiente para inactivar las esporas de *Clostridium perfringens* (Lanao, 2012) y (2) estudios previos reportaron tratamientos de 90 o

120 minutos de radiación UV_{254 nm} combinados con cloro como efectivos para inactivar *A. castellanii* (Chauque y Rott, 2021).

Los resultados obtenidos a partir de esta batería de ensayos de cribado muestran que ni la *Acanthamoeba* C1-211 ni sus BE sobreviven tras los tiempos de exposición estudiados en ninguna de las tres réplicas. Por ello, se realiza una segunda batería de ensayos de cribado en los que se toman muestras desde los 0,5 minutos hasta los 30 minutos, para que el tiempo de trabajo sea el mismo que en los ensayos de cloración y peroxidación. Los resultados de supervivencia de las tres réplicas de estos ensayos se presentan en la Tabla VI.9. A partir de estos resultados, se establece como rango de estudio para los ensayos de radiación solar, tanto RS_{280-800 nm} como RS_{300-800 nm}: de 0,5 a 30 min.

Tabla VI.9. Supervivencia de la *Acanthamoeba* C1-211 (AVL) y sus bacterias endocitobiontes (BE) en los ensayos de cribado de RS_{280-800 nm} a lo largo del tratamiento (0 min a 30 min).

TIEMPO (min)	SUPERVIVENCIA	
	AVL	BE
0	+++	+++
0,5	+++	+++
1	++-	++-
2	+--	+ - +
3	---	+ --
4	---	---
5	--+	--+
10	---	---
15	---	---
30	---	---

El símbolo más (+) indica supervivencia y el símbolo menos (-) indica no supervivencia de cada réplica realizada.

2. INACTIVACIÓN DE ACANTHAMOEBA Y SUS BACTERIAS

ENDOCITOBIONTES MEDIANTE TRATAMIENTOS DE

DESINFECCIÓN CONVENCIONALES

Para evaluar la efectividad de los desinfectantes convencionales, se analiza la inactivación de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 y de sus BE tras 30 minutos de exposición a diferentes dosis mediante la metodología puesta a punto en el Apartado 1 del presente capítulo. Se registra la inactivación logarítmica de ambas cepas de *Acanthamoeba* en función de la dosis de desinfectante y, para estimar las dosis necesarias para reducir 2 ($[Cl_2]_{99\%}$, $[H_2O_2]_{99\%}$, $D_{99\%}$) y 3 ($[Cl_2]_{99,9\%}$, $[H_2O_2]_{99,9\%}$, $D_{99,9\%}$) unidades logarítmicas cada cepa de *Acanthamoeba* estudiada, se emplean las ecuaciones de regresión lineal obtenidas a partir de la parte lineal de las gráficas de inactivación (como se describe en los Apartados III.4.3.2 y III.4.3.4). La inactivación de las BE se determina cualitativamente y se expresa en tres categorías: “no hay inactivación”, “inactivación parcial” o “inactivación total” de las BE (tal y como se define en el Apartado III.4.3.3), mediante un código de colores.

2.1. INACTIVACIÓN DE ACANTHAMOEBA MEDIANTE HIPOCLORITO DE SODIO

Para evaluar la efectividad de la desinfección con cloro (Cl_2), se analiza la inactivación de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 tras 30 minutos de exposición a concentraciones de Cl_2 que varían entre 1 y 500 mg/L. En la Figura VI.7.a se muestra la inactivación logarítmica de ambas cepas de *Acanthamoeba* en función de la concentración de Cl_2 inicial. Según los resultados, la exposición a Cl_2 resulta en una reducción gradual de la viabilidad de la *Acanthamoeba* C1-211 hasta su inactivación total tras ser expuesta a 100 mg/L durante 30 minutos. En el caso de la *Acanthamoeba* P31, se requieren exposiciones a 250 mg/L de Cl_2 durante 30 minutos para lograr su inactivación total. Los valores de $[Cl_2]_{99\%}$ y $[Cl_2]_{99,9\%}$ se recogen en la Tabla VI.10 e indican que la *Acanthamoeba* P31 requiere concentraciones de Cl_2 entre 2,5 y 2,9 veces superiores a las de la *Acanthamoeba* C1-211.

El cloro es el desinfectante más usado debido a su eficiencia frente a bacterias. Sin embargo, se necesitan dosis superiores a las típicamente empleadas en tratamientos de desinfección de agua potable o piscinas (1-5 mg/L) para inactivar protozoos como *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. (Environmental Protection Agency, EPA, 1999; Pichel y col., 2019) o amebas de vida libre. Además, las dosis efectivas varían entre géneros; por ejemplo, se requieren entre 1 y 7 mg/L de cloro libre durante 5-30 minutos para inactivar quistes de *Naegleria* spp. y dosis de 10 mg/L de

cloro durante 30 minutos para inactivar *Vermamoeba vermiformis* (Thomas, 2013). Sin embargo, el género *Acanthamoeba* es especialmente resistente al cloro (Gabriel y Panaligan, 2020), tal y como demuestran los resultados obtenidos, y que son necesarios tratamientos de 100 mg/L y 250 mg/L durante 30 minutos para inactivar las cepas estudiadas (*Acanthamoeba* C1-211 y P31, respectivamente). Estas dosis son 100 veces mayores que las típicamente empleadas para los procesos de potabilización; por tanto, cabe esperar encontrar AVL, y especialmente *Acanthamoeba*, en las redes de agua potable, en aguas recreativas (Fernández, 2014), fuentes ornamentales (Di Filippo y col., 2015) o, incluso, en redes de aguas hospitalarias (Nisar y col., 2022).

Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Storey y col. (2004), quienes observaron que tratamientos de 100 mg/L de cloro durante 10 minutos eran ineficientes frente *A. castellanii*. Aun así, las cepas de *Acanthamoeba* C1-211 y P31 son más sensibles que las de otros estudios, como la cepa de *Acanthamoeba* spp. estudiada por Gabriel y Panaligan (2020) que sufrió una reducción menor a 2 log tras dosis de 500 mg/L de Cl_2 durante 25 minutos, o algunas de las cepas evaluadas por Coulon y col. (2010), que sobrevivieron tras 30 minutos a 2 500 mg/L de Cl_2 . Ha de considerarse que estas resistencias corresponden a quistes, los cuales pueden ser entre 6 y 30 veces más resistentes al cloro que los trofozoítos (Dupuy y col., 2014) mientras que, en el presente estudio, los inóculos empleados contienen tanto quistes como trofozoítos.

Para evaluar la efectividad de la desinfección con Cl_2 en función del parámetro CT, se calcula la concentración del cloro residual presente tras los ensayos de inactivación (Tabla VI.11) mediante la metodología descrita en el Apartado III.4.2.1. Una vez calculado el valor CT para cada dosis de Cl_2 del estudio, se representa la inactivación logarítmica alcanzada para cada una de las cepas de *Acanthamoeba* del estudio en función del CT en la Figura VI.7.b. A partir de las ecuaciones de regresión lineal obtenidas de la parte lineal de las gráficas, se calculan los valores de $\text{CT}_{99\%}$ y $\text{CT}_{99,9\%}$; estos valores se recogen en la Tabla VI.10. Adicionalmente, se registra la evolución del pH en los ensayos realizados (Tabla VI.12).

El CT es un parámetro que ha generado controversia entre la comunidad científica. Técnicamente, el CT ha de calcularse como la integral bajo la curva de declive del cloro a lo largo de la reducción logarítmica y así lo han realizado diferentes autores estudiando el efecto de este desinfectante frente a diferentes microorganismos (Sivaganesan y col., 2003). Sin embargo, en un contexto práctico, este parámetro se calcula mediante el producto de la concentración de cloro residual y el tiempo de tratamiento (Erickson y Ortega, 2006); de esta forma, se facilita y

asegura una desinfección acorde a las normativas respecto a la concentración residual de cloro en el agua. De hecho, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) en su guía de metodologías de desinfección y oxidación (EPA, 1999) recomienda este segundo método, razón por la cual se ha empleado en el presente estudio.

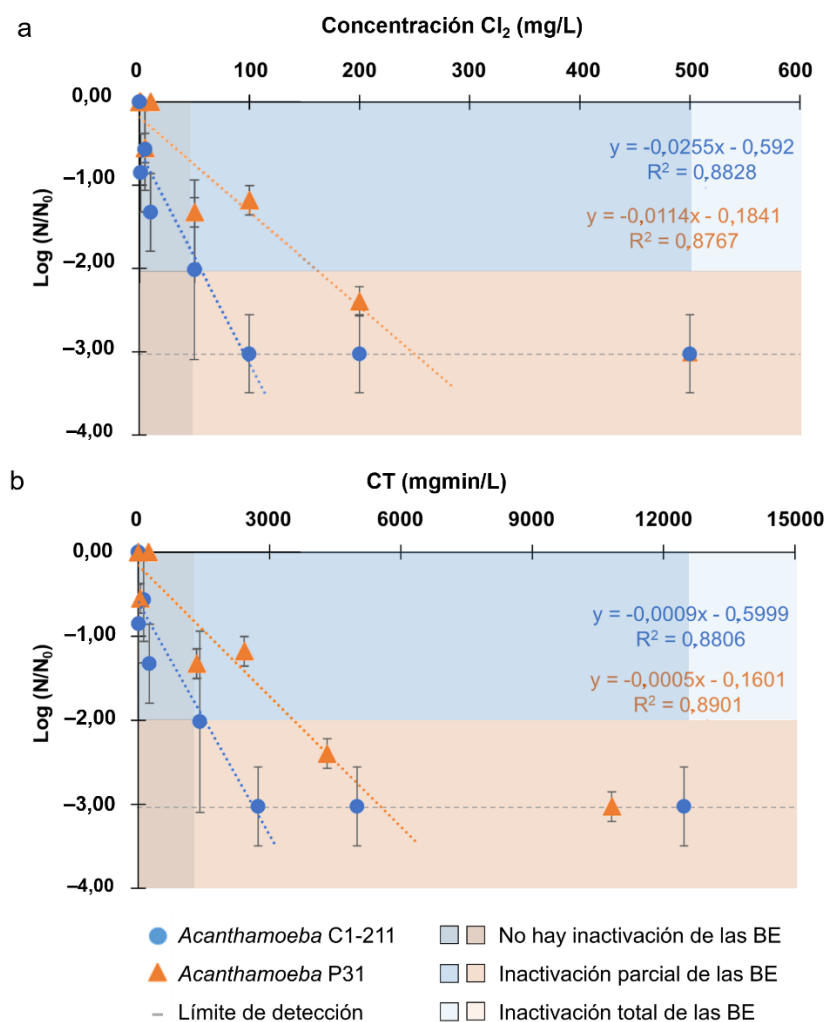


Figura VI.7. Inactivación de *Acanthamoeba* y sus BE tras 30 minutos de desinfección con hipoclorito sódico a diferentes (a) concentraciones de Cl_2 y (b) valores CT. Los colores azul (*Acanthamoeba* C1-211) y naranja (*Acanthamoeba* P31) más oscuros indican que la supervivencia de las BE no se vio afectada; los colores azul y naranja intermedios indican que la supervivencia de BE se vio afectada; los colores azul y naranja más claros (no presentes en estas gráficas) indican que las BE fueron totalmente inactivadas.

Tabla VI.10. Dosis de Cl_2 (mg/L) y valores CT (mgmin/L) para lograr la inactivación de 2 log (99 %) y 3 log (99,9 %) de *Acanthamoeba* y para inactivar completamente las BE.

C1-211			P31		
$[\text{Cl}_2]_{99\%}$	$[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$	$[\text{Cl}_2]_{\text{BE}}$	$[\text{Cl}_2]_{99\%}$	$[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$	$[\text{Cl}_2]_{\text{BE}}$
55	94	500	159	247	>500
CT _{99%}	CT _{99,9%}	CT _{BE}	CT _{99%}	CT _{99,9%}	CT _{BE}
1 556	2 667	12 471	3 680	5 680	>10 820

Los parámetros $CT_{99\%}$ y $CT_{99,9\%}$ permiten comparar la sensibilidad de las cepas estudiadas con otros estudios que hayan empleado diferentes condiciones. Atendiendo a los valores obtenidos, las cepas de *Acanthamoeba* estudiadas concuerdan con Loret y Greub (2010), quienes recopilaron datos de inactivación de AVL de diferentes estudios y estimaron que el $CT_{99\%}$ de los quistes de *Acanthamoeba* se encontraba entre 1 200 y 6 500 Cl_2 mgmin/L. Comparando con Dupuy y col. (2014), quienes obtuvieron un $CT_{99\%}$ de 865 mgmin/L frente a quistes de *Acanthamoeba*, las cepas del presente estudio son más resistentes al cloro.

Tabla VI.11. Concentración residual de Cl_2 (mg/L) tras los tratamientos de Cl_2 a diferentes dosis iniciales.

DOSIS (mg/L)	C1-211	P31
1	0,3	0,1
5	4,3	1,4
10	8,5	7,7
50	47,1	44,7
100	91,3	80,8
200	166,7	143,9
500	415,7	360,7

nd: no determinado.

Tabla VI.12. Valores de pH al inicio y al final de los tratamientos de Cl_2 .

DOSIS (mg/L)	0 min	30 min
0	7,0	7,0
1	7,0	7,1
5	8,4	8,2
10	8,6	7,6
50	9,9	9,0
100	10,3	9,6

2.2. INACTIVACIÓN DE LAS BE MEDIANTE HIPOCLORITO DE SODIO

Para evaluar la efectividad de la desinfección con Cl_2 , la inactivación de las BE de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 se evalúa tras 30 minutos de exposición a concentraciones de Cl_2 que varían entre 1 y 500 mg/L. La inactivación de las BE se determina cualitativamente en función de la concentración de Cl_2 inicial y se expresa mediante un código de colores en la Figura VI.7.a. Según los resultados, el Cl_2 afectó la supervivencia de las BE de ambas amebas en caso de que la concentración fuera igual o superior a 50 mg/L; a menores concentraciones, la supervivencia de las BE no se vio afectada. Esto parece indicar que las BE no se ven afectadas mientras los trofozoítos y quistes no se vean afectados. Las BE parecen empezar a verse afectadas cuando las concentraciones de Cl_2 son lo suficientemente elevadas como para penetrar los trofozoítos que las contienen, pero las estructuras quísticas parecen permanecer

intactas incluso inactivadas (He y col., 2021), protegiendo las bacterias del interior a concentraciones de Cl_2 superiores (Tabla VI.10).

Son necesarias dosis de Cl_2 de 500 mg/L para inactivar totalmente las BE de la *Acanthamoeba* C1-211, mientras que las bacterias protegidas por la *Acanthamoeba* P31 requieren dosis de Cl_2 aún mayores. Las concentraciones de Cl_2 necesarias para inactivar completamente las BE ($[\text{Cl}_2]_{\text{BE}}$) se recogen en la Tabla VI.10 e indican que **las BE requieren entre 2 y 5 veces dosis superiores que las cepas de *Acanthamoeba*** que las protegen para ser completamente inactivadas. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Wang y col. (2023a), quienes indican que, la ameba *Dictyostelium discoideum* y la bacteria protegida en su interior *Burkholderia agricolaris* presentan niveles de inactivación similares; sin embargo, esto puede deberse a la alta sensibilidad al cloro de esta ameba ($\text{CT}_{99,9\%}$ de 40 mgmin/L) o a la diferente relación que establecen *D. discoideum* y esta bacteria (Shu y col., 2018) comparado con *Acanthamoeba* y sus endocitobiontes (Greub y Raoult, 2004). Por otro lado, los resultados obtenidos concuerdan con García y col. (2007), quienes reportaron que *L. pneumophila* podía resistir 1 024 NaOCl mg/L mientras estuviera protegida por *A. polyphaga* ATCC 50998 (dosis de cloro cuatro veces mayores estando protegida por *A. polyphaga* comparando la bacteria libre).

Ha de tenerse en cuenta que el pH básico causado por estas concentraciones de cloro tan elevadas (Tabla VI.12) podrían afectar la supervivencia de la ameba, aunque, según Khan (2003), el género *Acanthamoeba* puede crecer a pH entre 4 y 12.

La inactivación de las BE también se representa en función del parámetro CT en la Figura VI.7.b y los valores CT necesarios para inactivar completamente las BE (CT_{BE}), definiendo este valor como aquel que da lugar a una ausencia total de crecimiento de BE bajo las condiciones estudiadas, se recogen en la Tabla VI.10. El CT necesario para inactivar las BE de la *Acanthamoeba* C1-211 es 4 veces superior al CT necesario para inactivar la *Acanthamoeba* C1-211 ($\text{CT}_{99,9\%}$). En el caso de la *Acanthamoeba* P31, el CT necesario para la inactivación de las BE ha de ser superior a 10 820 mgmin/L. Estos valores pueden servir de referencia para futuros estudios.

Debido a la generación de trihalometanos y otros subproductos potencialmente cancerígenos (Di Cesare et al., 2020), las dosis de Cl_2 demostradas como efectivas en los presentes resultados son demasiado elevadas como para emplearse en instalaciones reales, por tanto, se requieren tratamientos alternativos.

2.3. INACTIVACIÓN DE *ACANTHAMOEBA* MEDIANTE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Para evaluar la efectividad de la desinfección con H_2O_2 , la inactivación de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 se evalúa tras 30 minutos de exposición a concentraciones de H_2O_2 que varían entre 1 y 25 mM de H_2O_2 . La inactivación logarítmica alcanzada en función de la concentración de H_2O_2 inicial se muestra en la Figura VI.8. Según los resultados, conforme aumenta la dosis inicial de H_2O_2 , aumentan gradualmente las reducciones logarítmicas de ambas cepas de *Acanthamoeba* hasta ser completamente inactivadas tras la exposición durante 30 minutos a 7 mM (238 mg/L) y 10 mM (340 mg/L), en el caso de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31, respectivamente. Los valores, $[H_2O_2]_{99\%}$ y $[H_2O_2]_{99,9\%}$, respectivamente, se recogen en la Tabla VI.13 e indican que la *Acanthamoeba* P31 requiere concentraciones de H_2O_2 1,7 veces superiores a las de la *Acanthamoeba* C1-211. La concentración residual de H_2O_2 tras los tratamientos se registra en el Tabla VI.14 siguiendo la metodología descrita en el Apartado III.4.2.2.

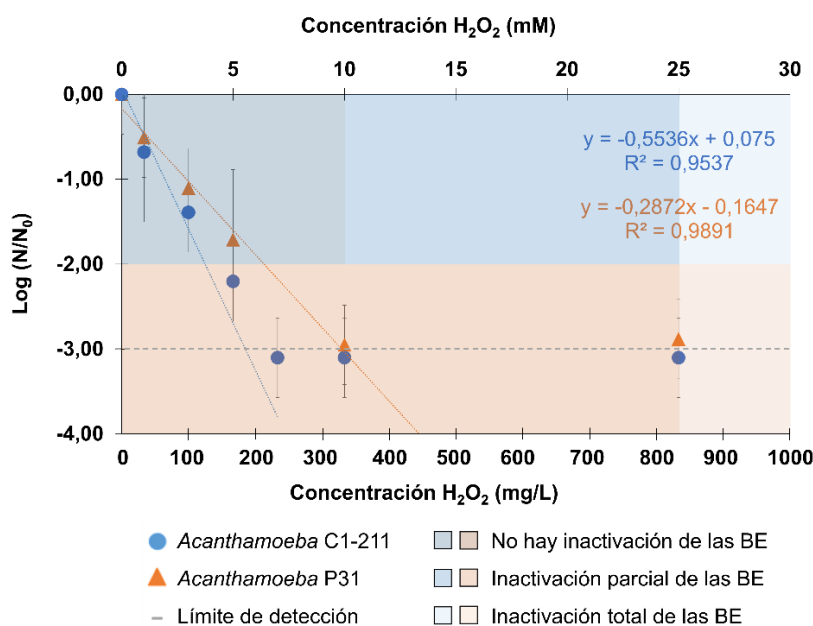


Figura VI.8. Inactivación de *Acanthamoeba* y sus BE tras los tratamientos de H_2O_2 . Los colores azul (*Acanthamoeba* C1-211) y naranja (*Acanthamoeba* P31) más oscuros indican que la supervivencia de las BE no se vio afectada; los colores azul y naranja intermedios indican que la supervivencia de BE se vio afectada; los colores azul y naranja más claros indican que las BE fueron totalmente inactivadas.

Tabla VI.13. Dosis de H_2O_2 (mM) para lograr la inactivación de 2 log (99 %) y 3 log (99,9 %) de *Acanthamoeba* y para inactivar completamente las BE.

C1-211			P31		
$[H_2O_2]_{99\%}$	$[H_2O_2]_{99,9\%}$	$[H_2O_2]_{BE}$	$[H_2O_2]_{99\%}$	$[H_2O_2]_{99,9\%}$	$[H_2O_2]_{BE}$
3,7	5,6	25	6,4	9,9	25

El peróxido de hidrógeno se ha empleado durante muchos años como desinfectante para potabilizar agua, descontaminar dispositivos médicos y controlar el crecimiento de biofilm gracias a su eficacia frente a un amplio espectro de microorganismos (Giannakis y col., 2016; Silva y Sagobal-Paz, 2021). Es además considerado como un tratamiento amigable con el medio ambiente al no producirse subproductos tóxicos, en comparación con tratamientos de cloración (Casini y col., 2017). Este compuesto se conoce por ser uno de los desinfectantes más eficientes frente *Acanthamoeba* para las soluciones del cuidado de lentes de contacto (Kolar y col., 2015). Sin embargo, hasta la fecha y hasta donde la autora conoce, nunca se ha estudiado su efectividad con la finalidad de tratar agua, lo cual es menos exigente.

Comparando con la bibliografía, las cepas evaluadas son mucho más sensibles a H_2O_2 que la mayoría de las cepas de *Acanthamoeba* evaluadas hasta la fecha (Thomas, 2013), requiriendo dosis en el rango molar en vez de milimolar. Si bien es verdad que la mayoría de estos estudios corresponden a análisis de formulaciones para líquidos de lentes de contacto, en los cuales se emplean elevadas dosis y cepas de *Acanthamoeba* especialmente resistentes. Además, es sabido que la sensibilidad de las AVL a los desinfectantes es altamente variable entre diferentes géneros, especies y cepas de AVL; por ejemplo, Coulon y col. (2010) tras evaluar la resistencia de diferentes cepas de *Acanthamoeba* al H_2O_2 , observaron reducciones logarítmicas que varían desde menos de 1 log tras 30 minutos a 4,8 log de reducción tras 20 minutos. Dichos resultados se obtuvieron evaluando quistes y, en el presente estudio, los inóculos empleados pueden contener trofozoítos y quistes inmaduros, los cuales son más sensibles que los quistes (Khunkitt y col., 1998).

Asimismo, el espesor de la pared quística, el número de poros y la edad del quiste influyen en la susceptibilidad de cada cepa a los diferentes desinfectantes y biocidas (Hiti et al., 2005) y esto puede explicar estas diferencias de susceptibilidad entre las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 y, también, las diferencias entre las cepas de estudio y las cepas de *Acanthamoeba* de otros estudios. Ha de tenerse en cuenta que también pueden estar involucrados otros factores; de hecho, los estudios de desinfección con H_2O_2 son difíciles de comparar entre sí ya que las condiciones experimentales son completamente diferentes según el propósito de la desinfección, las cepas diana, la matriz o el tiempo de contacto. Incluso falta estandarización en las unidades de medida: mg/L, % (m/v), % (v/v) o mM se encuentran entremezcladas en la bibliografía (Silva y Sagobal-Paz, 2022).

Tabla VI.14. Concentración residual de H₂O₂ (mM) tras los tratamientos de H₂O₂.

DOSIS (mM)	C1-211	P31
1	0,9	0,7
3	2,8	2,1
5	4,6	3,6
7	6,7	5,7
10	9,8	8,5
25	22,5	21,2

2.4. INACTIVACIÓN DE BE MEDIANTE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Para evaluar la efectividad de la desinfección con H₂O₂, la inactivación de las BE de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 se evalúa tras 30 minutos de exposición a concentraciones que varían entre 1 y 25 mM H₂O₂. La inactivación de las BE en función de la dosis inicial de H₂O₂ se determina cualitativamente y se expresa en tres categorías mediante el código de colores que se observan en la Figura VI.8. Las concentraciones de H₂O₂ necesarias para inactivar completamente las BE de las amebas de estudio ([H₂O₂]_{BE}) se recogen en la Tabla VI.13.

Los resultados muestran que las BE de ambas amebas requieren una exposición de 25 mM (850 mg/L) de H₂O₂ durante 30 minutos para ser inactivadas. Teniendo en cuenta que, según Mohammed (2016), dosis de 35 mg/L de H₂O₂ (1 mM) son suficientes para controlar las bacterias de transmisión hídrica, los resultados indican que las BE pueden resistir dosis de H₂O₂ muy superiores al encontrarse protegidas en el interior de amebas.

Comparando con los resultados obtenidos en el Apartado VI.2.3, las dosis de desinfectante necesarias para inactivar las BE resultan entre 2,5 y 3,5 veces superiores a las necesarias para inactivar la cepa de *Acanthamoeba* que las porta en su interior. Esto concuerda con el estudio de He y col. (2021), quienes demostraron que *Burkholderia* requería mayores dosis de cloro o dióxido de cloro que su ameba protectora *Dictyostelium discoideum* para ser inactivada y con los resultados obtenidos en los tratamientos con cloro (Apartado VI.2.2). Estos resultados subrayan el fuerte papel protector que realizan las amebas, el cual está relacionado con la robustez de la pared quística y, en este caso, con el mecanismo de acción del H₂O₂.

El H₂O₂ afecta a los microorganismos mediante daño externo e interno. Por un lado, el daño interno se debe a la generación de radicales hidroxilo (*OH) mediante reacciones Fenton intracelulares (producidas cuando se combina el H₂O₂ con iones internos, principalmente ferrosos, pero también férricos), al daño en el ADN y a la afectación de la función mitocondrial. Por otro lado, el daño externo se produce por el ataque de H₂O₂ a la pared celular, el cual,

aumenta su permeabilidad, provoca la entrada de más H_2O_2 a la célula y, consecuentemente, incrementa el daño celular y perjudica la viabilidad (Giannakis y col., 2016; Malato y col., 2009; Woyda-Ploszczyca y col., 2011).

Tal y como se muestra en la Figura VI.8, la supervivencia de las BE de la *Acanthamoeba* P31 se vio afectada a todas las dosis de H_2O_2 evaluadas. Por el contrario, la supervivencia de las BE de la *Acanthamoeba* C1-211 no se vio afectada hasta que la *Acanthamoeba* se inactivó completamente (dosis iniciales de al menos 10 mM). Estos resultados pueden deberse a diferencias en la proporción de trofozoítos y quistes del inóculo inicial. Posiblemente, la proporción de trofozoítos de la *Acanthamoeba* P31, más sensibles que los quistes, fuera mayor y las BE afectadas a bajas dosis de H_2O_2 sean las liberadas por los trofozoítos afectados y muertos. En cuanto a los resultados de la *Acanthamoeba* C1-211, las BE deben de encontrarse protegidas en el interior de la ameba y no ser liberadas, incluso pese a que el desinfectante penetre los trofozoítos y quistes y los inactive. Es posible que el compartimento celular de las amebas en el cual habitan las BE o la protección otorgada por vesículas que las amebas pueden expulsar cargadas con BE influyan en mayor o menor medida en la inactivación de las BE y sean causa de las diferencias entre las cepas de estudio (Greub y Raoult, 2004; Thomas y col., 2010).

El Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas, acepta dosis de 25 mg/L (0,7 mM) de H_2O_2 y concentraciones residuales de 5 mg/L (0,15 mM) de H_2O_2 para algunos productos tras la desinfección de agua potable (European Chemicals Agency, 2020). Tomando esta regulación en cuenta, las *Acanthamoeba* C1-211 y P31, al igual que sus BE, pueden superar fácilmente las plantas de tratamiento de agua basadas en este proceso de desinfección, colonizar los sistemas acuáticos artificiales como tuberías, grifos, fuentes o duchas de hospital, entre otras (Thomas y col., 2010) y suponer una amenaza para la salud de las personas expuestas. Por tanto, siguen siendo necesarias alternativas eficientes a la desinfección por H_2O_2 para inactivar las *Acanthamoeba* de estudio y sus BE.

2.5. INACTIVACIÓN DE *ACANTHAMOEBA* MEDIANTE RADIACIÓN SOLAR

Para evaluar la efectividad de la desinfección por radiación solar (RS), la inactivación de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 se evalúa a lo largo de 30 minutos de exposición a RS simulada. Se comparan dos rangos de longitudes de onda: 280-800 nm (que incluye radiación UV-A + UV-B) y 320-800 nm (que incluye UV-A). La inactivación logarítmica alcanzada en función de la dosis de radiación y del tiempo de exposición durante los tratamientos de RS_{320-800 nm} y RS_{280-800 nm} se muestran en la Figura VI.9.a y b, respectivamente. Los valores $D_{99\%}$ y $D_{99,9\%}$, calculados según se indica en el Apartado III.4.2.3, se recogen en la Tabla VI.15.

La radiación solar (RS) se ha empleado ampliamente por el poder germicida de la radiación ultravioleta (y el aumento de temperatura). Este poder germicida y los mecanismos implicados dependen de la longitud de onda, siendo el rango UV-C (200-280 nm) el más efectivo, seguido del UV-B (280-320 nm) y UV-A (320-400 nm). La desinfección por RS se limita al rango de 290 a 400 nm, ya que la atmosfera de la Tierra absorbe, de forma natural, la radiación UV-C y parte de la UV-B (Pichel y col., 2019). En el presente estudio, los dos rangos estudiados representan la exposición directa a RS (RS_{280-800 nm}) y la exposición a RS a través de un reactor de vidrio o plástico (RS_{320-800 nm}), como en un proceso de desinfección solar (SODIS por sus siglas en inglés), respectivamente. Por un lado, el rango UV-B actúa directamente sobre el ADN inhibiendo los procesos de replicación y transcripción e impidiendo el crecimiento y la replicación celular (Dalrymple y col., 2010; Giannakis y col., 2016; Pichel y col., 2019). La radiación UV-B también puede dañar el ADN indirectamente mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales, afectan además a diversos componentes celulares. Por otro lado, la radiación UV-A puede dañar el ADN indirectamente a través de la acción de ROS, aumentar la permeabilidad de la célula, alterar el metabolismo y comprometer la homeostasis celular (Adan y col., 2018; Giannakis y col., 2016).

Este proceso de desinfección amigable con el medioambiente y costo efectivo ha demostrado ser especialmente efectivo frente a bacterias y virus; sin embargo, los protozoos son más resistentes (Environmental Protection Agency, EPA, 1999): mientras que 2,5 h de RS pueden reducir 5 log la población bacteriana de *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, 8 h de tratamiento apenas logran la inactivación de 1 log de los quistes de *A. polyphaga* (Lonnen y col., 2005).

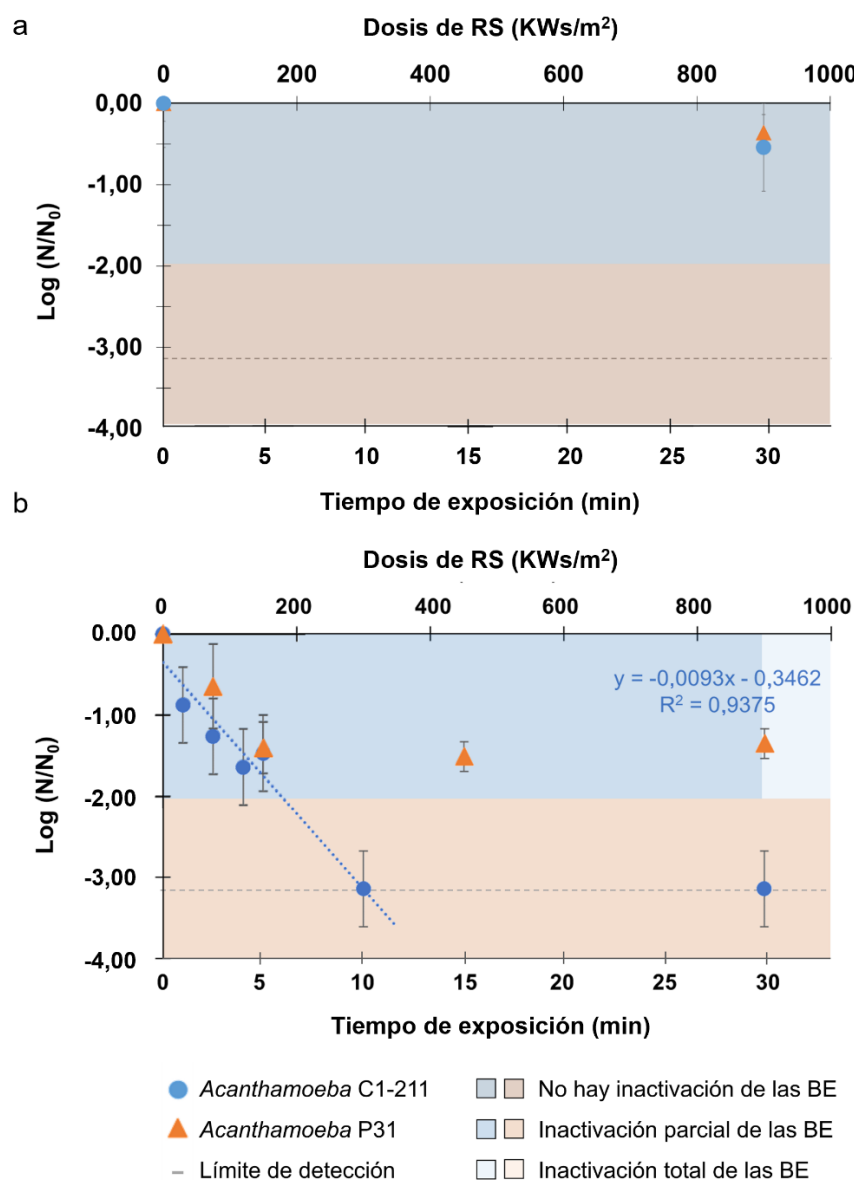


Figura VI.9. Inactivación de *Acanthamoeba* y sus BE tras los tratamientos de RS_{320-800 nm} y RS_{280-800 nm}. Los colores azul (*Acanthamoeba* C1-211) y naranja (*Acanthamoeba* P31) más oscuros indican que la supervivencia de las BE no se vio afectada; los colores azul y naranja intermedios indican que la supervivencia de BE se vio afectada; los colores azul y naranja más claros indican que las BE fueron totalmente inactivadas.

Tabla VI.15. Dosis de RS (D, en KWs/m²) para lograr la inactivación de 2 log (99 %) y 3 log (99,9 %) de *Acanthamoeba* y para inactivar completamente las BE.

TRATAMIENTO	C1-211			P31		
	D _{99%}	D _{99,9%}	D _{BE}	D _{99%}	D _{99,9%}	D _{BE}
RS _{320-800nm}	>900	>900	>900	>900	>900	>900
RS _{280-800nm}	178	285	900	-	-	>900

Según los resultados, la $RS_{320-800\text{ nm}}$ no logra inactivar las *Acanthamoeba* de estudio tras 30 minutos de exposición, indicando que el rango UV-A (320-400 nm) es completamente ineficaz frente a estas cepas, aunque pudo tener un efecto sinérgico con la radiación UV-B durante los ensayos de $RS_{280-800\text{ nm}}$. En comparación, el rango UV-B (280-320 nm) fue capaz de reducir la viabilidad de las cepas de *Acanthamoeba* de estudio, inactivando completamente la *Acanthamoeba* C1-211 tras una dosis de 300 KWs/m^2 y, parcialmente, la *Acanthamoeba* P31. En este segundo caso, se obtuvo una reducción de 1,5 log tras una dosis de 150 KWs/m^2 que se mantuvo tras exposiciones a dosis de 900 KWs/m^2 , por lo cual, se desconocen los valores $D_{99\%}$ y $D_{99,9\%}$ de esta *Acanthamoeba*. Esta reducción parcial debe corresponder a la inactivación de los trofozoítos o de los quistes inmaduros (que pueden estar presentes en el inóculo inicial de los ensayos), mientras que los quistes de la *Acanthamoeba* P31 permanecen viables tras la exposición.

Resulta complicado establecer comparaciones entre diferentes estudios debido a las diferencias en las condiciones de los tratamientos, especialmente las longitudes de onda e intensidades, y si se están analizando quistes o trofozoítos. Aun así, parece que los resultados obtenidos relativos a la $RS_{320-800\text{ nm}}$ concuerdan con los de Adan y col. (2018), quienes obtuvieron menos de 1 log de reducción de los trofozoítos de una cepa de *Acanthamoeba* tras 125 minutos de radiación UV-A. Respecto a los resultados obtenidos en los ensayos de $RS_{280-800\text{ nm}}$, las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 parecen más sensibles que las cepas estudiadas por Heaselgrave y Kilvington (2011) y Lonnen y col. (2005). Heaselgrave y Kilvington (2011) lograron una reducción de 2 log de los quistes de *A. castellanii* tras una exposición a 550 W/m^2 de $RS_{290-800\text{ nm}}$ durante 6 horas ($D_{99\%} = 11.880\text{ KWs/m}^2$). Lonnen y col. (2005) obtuvieron una reducción de 2 log de los trofozoítos de *A. polyphaga* tras 2 h de 870 W/m^2 de $RS_{300\text{ nm} - 10\text{ }\mu\text{m}}$ ($D_{99\%} = 6.264\text{ KWs/m}^2$), mientras que los quistes apenas se vieron afectados (menos de 1 log de reducción) tras 8 h de desinfección solar (dosis de 25.056 KWs/m^2).

2.6. INACTIVACIÓN DE LAS BE MEDIANTE RADIACIÓN SOLAR

Para evaluar la efectividad de la desinfección mediante RS, se evalúa la inactivación de las BE de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 a lo largo de 30 minutos de exposición a $RS_{320-800\text{ nm}}$ y $RS_{280-800\text{ nm}}$. La inactivación de las BE en función del tiempo y la dosis de RS se determina cualitativamente y se expresa en tres categorías, mediante el código de colores que se observan en la Figura VI.9. Las dosis de $RS_{320-800\text{ nm}}$ y $RS_{280-800\text{ nm}}$ necesarias para inactivar completamente las BE de estudio (D_{BE}) se recogen en la Tabla VI.15.

Según los resultados, y al igual que ocurría con las AVL (Apartado VI.2.5), el tratamiento de 30 minutos de $RS_{320-800\text{ nm}}$ no inactiva las BE de ninguna de las *Acanthamoeba* de estudio, incluso a las exposiciones más elevadas (900 KWs/m^2). Estos resultados concuerdan con Adan y col. (2018), quienes detectaron que *Escherichia coli* apenas se veía afectada tras 150 min de exposición a UV-A en presencia de *Acanthamoeba*, aunque la supervivencia de la bacteria se relacionó con la dispersión de la luz UV y no con la protección de la ameba. Por el contrario, la $RS_{280-800\text{ nm}}$ sí que afecta las BE y, como ocurre en los ensayos de desinfección con Cl_2 y H_2O_2 , las dosis de desinfectante necesarias para inactivar las BE son mayores que las necesarias para inactivar la *Acanthamoeba* que las protege. Concretamente, las BE de la *Acanthamoeba* C1-211 necesitan dosis de $RS_{280-800\text{ nm}}$ ($D_{BE} = 900\text{ KWs/m}^2$) 3 veces superiores a la necesaria para inactivar totalmente a la *Acanthamoeba* protectora. He y col. (2021) también indicaron que las AVL eran capaces de proteger bacterias en su interior incluso tras ser inactivadas por $UV_{254\text{ nm}}$. En su estudio, describen que los quistes no se rompían o dañaban tras la radiación $UV_{254\text{ nm}}$, sino que sugieren que estos pueden absorber y filtrar la luz UV, permitiendo que sólo una fracción alcance las bacterias internalizadas. En el caso de la *Acanthamoeba* P31, la $RS_{280-800\text{ nm}}$ afectó a las bacterias protegidas, pero algunas sobrevivieron tras 900 KWs/m^2 . Dado que 30 minutos de exposición a $RS_{280-800\text{ nm}}$ no fueron suficientes para inactivar la *Acanthamoeba*, es comprensible que tampoco lo fueran para inactivar sus BE y, por tanto, se necesitan dosis superiores a 900 KWs/m^2 de $RS_{280-800\text{ nm}}$.

Como se puede comprobar, la radiación solar no logra la inactivación completa de la *Acanthamoeba* P31 ni sus BE, subrayando la necesidad de procesos de desinfección alternativos.

3. INACTIVACIÓN DE ACANTHAMOEBA Y SUS BACTERIAS ENDOCITOBIONTES MEDIANTE TRATAMIENTOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN

Para evaluar la efectividad de los tratamientos avanzados de oxidación, se comprueba la inactivación de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 y de sus BE tras la exposición a diferentes dosis de Cl_2 , H_2O_2 y RS mediante la metodología puesta a punto en el Apartado 1 del presente capítulo. La inactivación logarítmica de ambas cepas de *Acanthamoeba* se muestra en función de la dosis de desinfectante y, mediante las ecuaciones de regresión lineal obtenidas de la parte lineal de las gráficas, se estiman las dosis necesarias para reducir 2 ($[\text{Cl}_2]_{99\%}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_{99\%}$, $D_{99\%}$) y 3 ($[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]_{99,9\%}$, $D_{99,9\%}$) unidades logarítmicas cada cepa (como se describe en los Apartados III.4.3.2 y III.4.3.4). La inactivación de las BE se determina cualitativamente y se expresa en tres categorías: “no hay inactivación”, “inactivación parcial” o “inactivación total” de las BE (tal y como se define en el Apartado III.4.3.3), mediante un código de colores.

3.1. INACTIVACIÓN DE ACANTHAMOEBA MEDIANTE COMBINACIÓN DE HIPOCLORITO SÓDICO Y RADIACIÓN SOLAR

Para determinar la efectividad de la desinfección mediante la combinación de cloro y radiación solar ($\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ y $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$), se evalúa la inactivación de las *Acanthamoeba* de estudio a lo largo de 30 minutos de exposición a diferentes dosis de Cl_2 (de 1 a 500 mg/L) y RS simulada. Los resultados en función de la dosis inicial de cloro se muestran en la Figura VI.10 y los valores de $[\text{Cl}_2]_{99\%}$, $[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$ se presentan en la Tabla VI.16. La evolución del cloro residual (determinada según describe el Apartado III.4.2.1) y el pH se registra en las Tablas VI.17 y VI.18, respectivamente.

Mediante la combinación de Cl_2 y RS, se pueden generar *in situ* especies oxidantes altamente reactivas, como el ozono y los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Durante este proceso, también se forman especies reactivas de cloro (RCS), como Cl^\cdot , $\text{Cl}_2^{\cdot-}$ y ClO^\cdot , las cuales pueden contribuir a la inactivación microbiana (Polo-López y col., 2017; Wang y col., 2023a). De hecho, se ha demostrado que la combinación de cloro y la luz solar puede acelerar drásticamente la inactivación de formas microbianas resistentes al cloro como endosporas de *Bacillus subtilis* (Forsyth y col., 2013) y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Zhou y col., 2014).

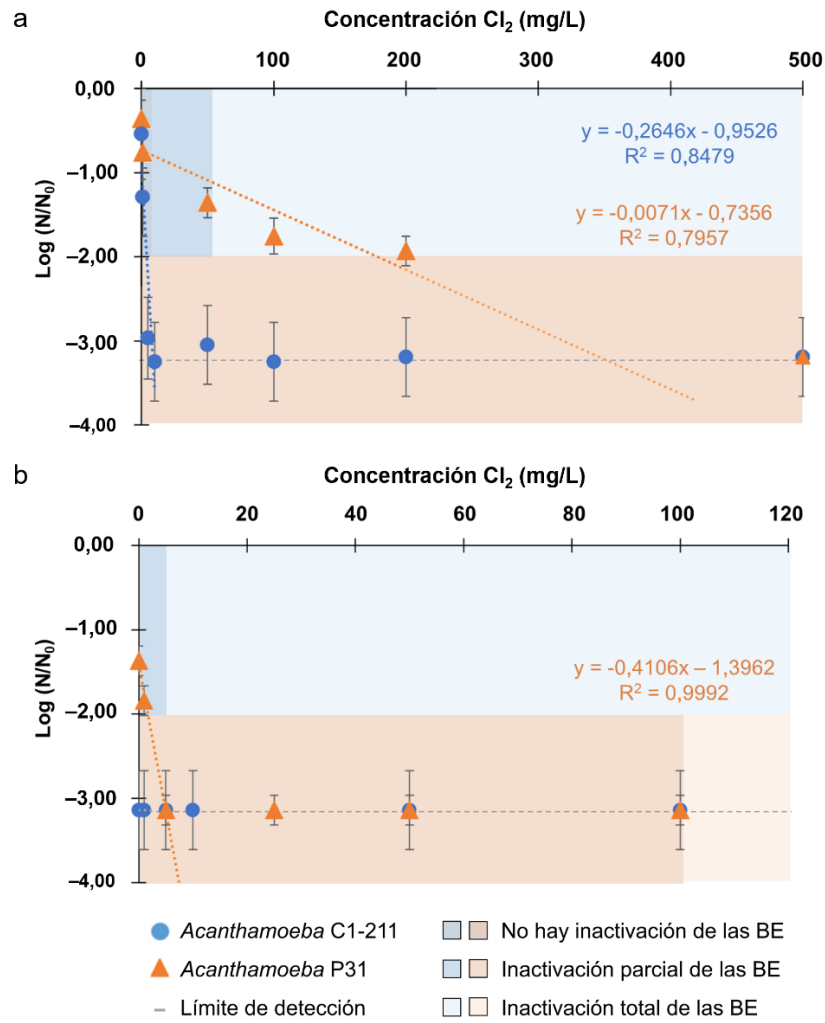


Figura VI.10. Inactivación de *Acanthamoeba* y sus BE tras los tratamientos de (a) $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ y (b) $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$. Los colores azul (*Acanthamoeba* C1-211) y naranja (*Acanthamoeba* P31) más oscuros (no presentes en estas gráficas) indican que la supervivencia de las BE no se vio afectada; los colores azul y naranja intermedios indican que la supervivencia de BE se vio afectada; los colores azul y naranja más claros indican que las BE fueron totalmente inactivadas.

Tabla VI.16. Dosis de Cl_2 (mg/L) para lograr la inactivación de 2 log (99 %) y 3 log (99,9 %) de *Acanthamoeba* y para inactivar completamente las BE en los tratamientos de combinación $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ y $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$.

TRATAMIENTO	C1-211			P31		
	$[\text{Cl}_2]_{99\%}$	$[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$	$[\text{Cl}_2]_{\text{B}}$	$[\text{Cl}_2]_{99\%}$	$[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$	$[\text{Cl}_2]_{\text{BE}}$
$\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800\text{nm}}$	4	8	50	178	319	500
$\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800\text{nm}}$	-	-	5	1	4	100

Los resultados indican que **la combinación de Cl_2 y RS**, utilizando ambos rangos de longitudes de onda, **potencia la inactivación de la *Acanthamoeba* C1-211**, mientras que **la inactivación de la *Acanthamoeba* P31** prácticamente **sólo mejora al combinar Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$** . El tratamiento $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ no mejora su inactivación (Apartados VI.2.1 y 2.5). De esta forma, se observa que la inactivación de *Acanthamoeba* es mucho más eficiente con la combinación de Cl_2 y RS que mediante los tratamientos convencionales de Cl_2 o SR, especialmente cuando se emplea la $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$.

La combinación de 5 mg/L de Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ alcanza una reducción de 3 log de ambas *Acanthamoeba*, reduciendo entre 20 y 50 veces la dosis de Cl_2 necesaria para su inactivación, haciendo este tratamiento de desinfección atractivo e interesante para eliminar AVL del agua. Pese a que los tratamientos de $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ y 5 mg/L de $\text{Cl}_2/\text{SR}_{280-800 \text{ nm}}$ son igualmente eficientes frente a la *Acanthamoeba* C1-211, mantener un efecto residual de desinfección tras el tratamiento, como en el caso de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ (Tabla VI.17), produce resultados beneficiosos (Khajouei y col., 2022). Estos resultados concuerdan con los reportados por Wang y col. (2023a), quienes obtuvieron eficiencias similares cuando testearon la combinación de 5 mg/L de Cl_2 y RS frente a la ameba *Dictyostelium discoideum*: una reducción de 3 log tras 10 minutos de exposición que incrementó a 5 log si se prolongaba el tiempo a 20 minutos; aunque ha de recordarse que esta especie de AVL es mucho más sensible que *Acanthamoeba* (como se indica en el Apartado 2.2 del presente capítulo).

Comparando las cepas de estudio, la combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ resulta efectiva eliminando a la *Acanthamoeba* C1-211, pero es menos eficiente frente a la *Acanthamoeba* P31 (los valores $[\text{Cl}_2]_{99\%}$ y $[\text{Cl}_2]_{99,9\%}$ de esta AVL son mayores comparando con el tratamiento convencional). Teniendo en cuenta que la combinación de cloro y radiación solar combina múltiples mecanismos para inactivar patógenos, (1) la reacción directa de HOCl/OCl^- , (2) la fotólisis directa por la radiación UV y (3) los ataques de las moléculas oxidativas -ROS, RCS y O_3^- (Remucal y Manley, 2016), las variaciones al combinar Cl_2 con $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ o $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ deben de estar relacionadas con los diferentes mecanismos de desinfección implicados (y el grado de los mismos).

La combinación de cloro y RS, y la subsecuente formación de especies reactivas oxidantes, son dependientes del pH y la longitud de onda. Atendiendo al pH de los ensayos (Tabla VI.18) y, considerando la constante de disociación ácida del HOCl ($\text{pK}_a = 7.5$), el OCl^- debe de ser la especie de cloro predominante en la mayoría de los ensayos de combinación de Cl_2 y RS realizados. Las dos especies de cloro intercambiables (HOCl/OCl^-) tienen diferente espectro de absorción de

radiación UV-visible: el coeficiente de absorción de OCI^- tiene su máximo a 292 nm y, por tanto, la irradiación de OCI^- a 280-800 nm (durante los ensayos $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$) debe de producir mayoritariamente $\cdot\text{OH}$ gracias a las subsecuentes reacciones (Reacciones 4-9, Capítulo I). A longitudes de onda superiores a 320 nm, como las irradiadas durante los ensayos de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ y tras las sucesivas reacciones (Reacciones 10-11, Capítulo I), el ozono es la principal especie oxidante producida (Remucal y Manley, 2016; Zhou y col., 2014). Atendiendo a los resultados, parecería que los radicales $\cdot\text{OH}$ son una ruta más eficiente que el ozono para inactivar las *Acanthamoebas* de estudio.

Tabla VI.17. Concentración residual de Cl_2 (mg/L) tras los tratamientos de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ y $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$.

DOSIS (mg/L)	C1-211		P31	
	$\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$	$\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$	$\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$	$\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$
1	0,5	0,2	0,1	0,8
5	0,9	1,6	2,6	2,4
10	6,9	1,9	5,6	6,0
50	14,7	3,9	16,9	10,6
100	52,1	24,3	35,9	29,6
200	115,8	nd	96,1	nd
500	234,2	nd	248,5	nd

nd: no determinado.

Tabla VI.18. pH de los tratamientos $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ y $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ a diferentes tiempos.

DOSIS (mg/L)	$\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$			$\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$	
	0 min	5 min	10 min	0 min	30 min
0	7,0	7,0	7,1	7,0	7,4
1	nd	nd	nd	7,1	7,4
5	8,4	8,6	9,5	8,6	7,4
10	nd	Nd	nd	8,7	8,2
50	9,9	10,0	10,3	9,9	9,0
100	nd	nd	nd	10,3	9,8

nd: no determinado.

Las RCS formadas durante los tratamientos de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ y $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ (Reacciones 4, 5, 12 y 13, Capítulo I) deben de colaborar también en la inactivación microbiana, aunque no está claro hasta qué punto, ya que el Cl^\bullet reacciona de forma más selectiva que $\cdot\text{OH}$. Además, todavía no se ha estudiado exhaustivamente si la producción de Cl^\bullet varía en función de la longitud de onda irradiada (Remucal y Manley, 2016) y, por tanto, el papel potencial de los RCS en la inactivación microbiana en los presentes ensayos se desconoce. Al no ser este el objetivo del presente estudio sería recomendable realizar experimentación fundamental para poder entender mejor el poder desinfectante de los RCS durante estos tratamientos.

Forsyth y col. (2013) sugieren la activación de cloro mediante radiación UV-A como una estrategia atractiva para potenciar la inactivación de patógenos resistentes al cloro. Sin embargo, parece que son necesarias bajas longitudes de onda (como las empleadas durante la combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$) para inactivar eficientemente a *Acanthamoeba*, incluso en presencia de cloro. En este sentido, Chauque y Rott (2021) evaluaron la capacidad desinfectante de $\text{Cl}_2/\text{UV}_{254 \text{ nm}}$ frente a una cepa de *A. castellanii*. Observaron que concentraciones de Cl_2 bajas (entre 1 y 8 mg/L) durante exposiciones prolongadas (dos rondas de 90 min) a $\text{UV}_{254 \text{ nm}}$ ($2,43 \text{ W/m}^2$) eran efectivas para inactivar tanto trofozoítos como quistes. Pese a las bajas dosis de cloro que fueron empleadas para reducir el coste del tratamiento, fue necesario un gran consumo de energía para cubrir los extensos tiempos de exposición. Dependiendo de los usos del agua y las necesidades en el punto de uso, esos tiempos tan elevados pueden no ser factibles. Además, como en dicho estudio no se evaluó la capacidad de desinfección de las BE, se desconoce si podrían sobrevivir o no a ese tratamiento.

Según los resultados obtenidos, la combinación de 5 mg/L de Cl_2 con ambos rangos de longitudes de onda de RS alcanza la inactivación total de la *Acanthamoeba* C1-211 y, comparando con los resultados de cloración (Apartado VI.2.1), **reduce 20 veces la dosis de Cl_2 necesaria para lograr el mismo efecto**. En el caso de la *Acanthamoeba* P31, la reducción obtenida mediante la combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ es similar a la obtenida por el tratamiento de cloración: se necesitaron en torno a 300 mg/L durante 30 minutos para lograr una reducción de 3 log de la ameba. Por el contrario, **la combinación de 5 mg/L de Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ inactiva totalmente la *Acanthamoeba* P31, reduciendo 50 veces la dosis de Cl_2 necesaria**.

La inactivación de las amebas también se determina a diferentes tiempos a lo largo de los tratamientos de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$, tal y como se muestra en la Figura VI.11. Los valores de $D_{99\%}$ y $D_{99,9\%}$ estimados a partir de estos resultados se presentan en la Tabla VI.19. En el caso de combinar 1 o 5 mg/L de Cl_2 con $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$, la reducción de la *Acanthamoeba* C1-211 (Figura VI.11.a) no se ve mejorada en comparación con el tratamiento de $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ (Figura VI.9.b). La combinación de 50 mg/L con $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ acelera la inactivación de la *Acanthamoeba* C1-211, alcanzando una reducción de 3 log tras aproximadamente 5 minutos de exposición, en vez de 10 minutos, reduciendo a la mitad la dosis de $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ necesaria para inactivar completamente la ameba (Tabla VI.15). En el caso de la *Acanthamoeba* P31 (Figura VI.11.b), la combinación de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ mejora la inactivación comparando con los tratamientos convencionales de Cl_2 o $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$: se logra una inactivación de 2, 3 y 4 log al combinar $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ con 1, 5 y 50 mg/L de Cl_2 , respectivamente, durante 10 minutos en vez de 30, reduciendo por tanto la dosis de $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ necesaria al menos 3 veces.

Atendiendo conjuntamente a los resultados de ambas amebas, **la combinación de 5 mg/L de Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ durante 10 minutos** logra una inactivación de 3 log para ambas cepas, **reduciendo drásticamente la dosis de Cl_2 necesaria para su inactivación: entre 20 y 50 veces.**

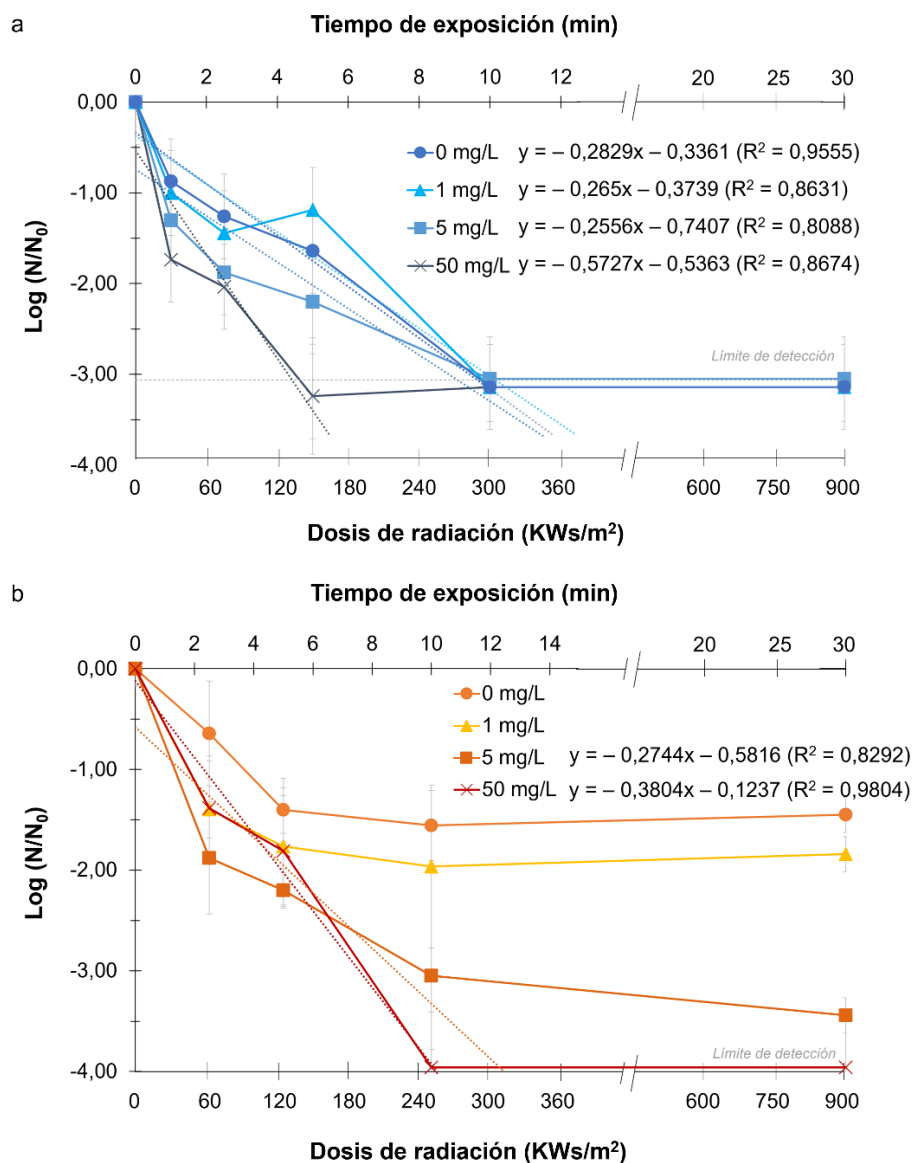


Figura VI.11. Inactivación de las *Acanthamoeba* (a) C1-211 y (b) P31 a lo largo de 30 minutos de combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ con diferentes dosis de Cl_2 (mg/L)

Tabla VI.19. Dosis de RS (D, en KWs/m^2) para lograr la inactivación de 2 log (99 %) y 3 log (99,9 %) de *Acanthamoeba* y para inactivar completamente las BE en los tratamientos de combinación $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ con distintas dosis de Cl_2 (mg/L).

$\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$	C1-211			P31		
	D _{99%}	D _{99,9%}	D _{BE}	D _{99%}	D _{99,9%}	D _{BE}
0 mg/L	176	282	900	-	-	>900
1 mg/L	184	297	900	-	-	>900
5 mg/L	148	265	900	155	264	>900
50 mg/L	77	129	300	148	227	>900

3.2. INACTIVACIÓN DE BACTERIAS ENDOCITOBIONTES MEDIANTE COMBINACIÓN DE HIPOCLORITO SÓDICO Y RADIACIÓN SOLAR

Para determinar la efectividad de inactivación de los tratamientos de combinación de Cl_2 con RS frente a las BE protegidas por las AVL de estudio, se determina cualitativamente la supervivencia de las bacterias a lo largo de exposiciones a diferentes dosis de cloro (de 1 a 500 mg/L) durante 30 minutos de $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$. La inactivación de las BE se presenta en la Figura VI.12. Las dosis de Cl_2 ($[\text{Cl}_2]_{\text{BE}}$) necesarias para inactivar completamente las BE se recogen en la Tabla VI.16.

Según los resultados y comparando con los obtenidos en los tratamientos de cloración (Apartado VI.2.2) **la combinación de Cl_2 y RS disminuyó drásticamente la dosis necesaria de Cl_2 para inactivar el crecimiento de las BE de la *Acanthamoeba* C1-211: de 500 Cl_2 mg/L a 50 mg/L al combinar Cl_2 y $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ y a 5 mg/L al combinar con $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$. En el caso de la *Acanthamoeba* P31, se necesitan dosis de 500 mg/L para inactivar el crecimiento de las BE al combinar Cl_2 y $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$, mientras que si se combina Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$, se inactivan las BE con dosis de 100 mg/L de Cl_2 , reduciendo más de 5 veces la dosis de Cl_2 necesaria.**

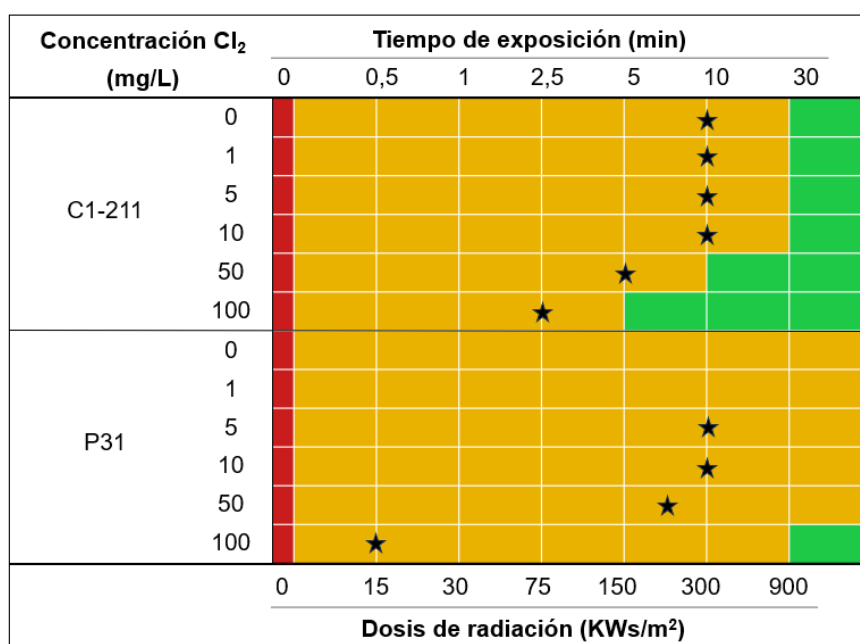


Figura VI.12. Inactivación de las BE de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 tras los tratamientos de RS y $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$. La supervivencia de las BE se determina cualitativamente y se indica según los colores: rojo para la supervivencia de las BE no afectadas, naranja para la supervivencia de las BE afectadas y verde para la inactivación completa de las BE. Las estrellas negras indican el tiempo y la dosis de RS necesarios para inactivar las correspondientes cepas de *Acanthamoeba* a las diferentes dosis de Cl_2 evaluadas (mg/L).

La inactivación de las BE también se determina a diferentes tiempos a lo largo de los tratamientos $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$, tal y como se muestra en la Figura VI.12. A partir de estos resultados, se estiman los valores de D_{BE} necesarios para alcanzar la inactivación completa de las BE. Estos valores se recogen en la Tabla VI.19.

La combinación de Cl_2 y RS, como ocurría en los tratamientos de desinfección convencional, requiere dosis mucho más elevadas para la inactivación de BE que para la de las cepas de *Acanthamoeba*, reforzando el rol protector de las amebas hacia las bacterias. La combinación $\text{Cl}_2/\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ requiere dosis de cloro 10 veces mayores para inactivar las BE de las *Acanthamoeba* C1-211 comparando con su ameba protectora (50 vs. 5 mg/L, respectivamente). Sin embargo, este tratamiento no fue efectivo frente a las BE de la *Acanthamoeba* P31, igual que tampoco lo fue frente a la *Acanthamoeba* P31. En el caso de combinar Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$, las BE de la *Acanthamoeba* C1-211 se inactivaron con dosis de 5mg/L de Cl_2 , al igual que la *Acanthamoeba* C1-211, pero fue necesario prolongar el tiempo de exposición de 10 a 30 minutos. Respecto a la *Acanthamoeba* P31, la dosis de cloro tuvo que incrementarse 20 veces para inactivar las BE (de 5 a 100 mg/L, comparando con la *Acanthamoeba* P31). Esto puede deberse a la pared quística, que actúa como un caparazón extremadamente resistente, proporcionando un ambiente protector en el interior, ya esté activo o no el quiste (Garajová y col., 2019).

Comparando con los tratamientos individuales, la combinación de Cl_2 y RS y la subsecuente generación de moléculas oxidantes (ROS, RCS y O_3) derivan en tratamientos de desinfección más eficientes, especialmente $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$. Concretamente, la combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$ requiere dosis de cloro 10 veces inferiores para inactivar las BE de la *Acanthamoeba* C1-211 comparando con el tratamiento convencional de Cl_2 (de 500 a 50 mg/L). Esta combinación, equivalente a añadir cloro a un proceso SODIS y efectiva frente a las BE de la *Acanthamoeba* C1-211, no logra la inactivación total de las BE de la *Acanthamoeba* P31 bajo las condiciones estudiadas, lo cual, concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de la supervivencia de esta *Acanthamoeba*. En el caso de combinar Cl_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$, al igual que ocurre con las cepas de *Acanthamoeba*, el proceso también resulta más eficiente que los tratamientos convencionales de Cl_2 o RS: el tratamiento de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ reduce entre 5 y 100 veces la dosis de cloro necesaria para alcanzar la inactivación total de las BE.

Esta mejora en la eficiencia de desinfección mediante la combinación de cloro y RS también la han obtenido otros autores en estudios previos: Chauque y Rott (2021) inactivando *A. castellanii*, Wang y col. (2023a) inactivando *D. discoideum* y *B. agriculturalis* y Zhou y col. (2014) inactivando

ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, entre otros. Por tanto, los resultados ponen de manifiesto que este es un tratamiento de desinfección atractivo para futuros estudios de optimización (de dosis de Cl_2 y tiempos de exposición), de cara a diseñar y poner a punto tratamientos acordes a diferentes usos del agua.

Merece la pena recordar que la generación de subproductos como los trihalometanos o ácidos haloacéticos se producen a partir de la cloración de la materia orgánica disuelta (MOD) presente de manera natural en las aguas. Si por combinación con la RS se puede reducir la dosis de cloro aplicada y el tiempo de exposición, se puede deducir que, probablemente, se pudiera reducir considerablemente la generación de subproductos organoclorados asociados utilizando la combinación de ambos agentes (Remucal y Manley, 2016). No obstante, se necesitan futuros estudios para implementar este tratamiento y prevenir la formación de subproductos orgánicos no deseados.

3.3. INACTIVACIÓN DE *ACANTHAMOEBA* MEDIANTE COMBINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y RADIACIÓN SOLAR

Para determinar la efectividad de desinfección mediante la combinación de peróxido de hidrógeno y radiación solar, la inactivación de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 se evalúa a lo largo de 30 minutos de exposición a diferentes dosis de H_2O_2 (de 1 a 25 mM) y $RS_{280-800\text{ nm}}$ simulada. En la Figura VI.13 se muestra la inactivación logarítmica de ambas cepas de *Acanthamoeba* en función del tiempo de exposición y la dosis de radiación a diferentes dosis iniciales de H_2O_2 . Los valores $D_{99\%}$ y $D_{99,9\%}$, calculados según indica la metodología del Apartado III.4.2.3, se recogen en la Tabla VI.20. El registro de la concentración residual de H_2O_2 se muestra en la Tabla VI.21 (siguiendo la metodología descrita en el Apartado III.4.2.2).

Combinar H_2O_2 y RS puede convertirse en un tratamiento de desinfección muy eficiente al aunar las ventajas del H_2O_2 , la RS y los PAO; sin embargo, los mecanismos de inactivación microbiana de este tratamiento todavía no están claros (Agulló-Barceló y col., 2013). Muchos de los estudios desarrollados hasta la fecha evalúan la inactivación de bacterias; sin embargo, este es el primer estudio en el que se evalúa la inactivación de AVL y sus BE mediante la combinación $H_2O_2/RS_{280-800\text{ nm}}$. No se estudia la combinación con RS en el rango de 320 a 800 nm ya que la fotólisis del enlace peroxídico de H_2O_2 (y la consecuente generación de radicales $\cdot OH$) se produce cuando la molécula absorbe radiación UV a longitudes de onda inferiores a 300 nm (Malato y col., 2009).

Los resultados muestran que, como norma general, la combinación de H_2O_2 y $RS_{280-800\text{ nm}}$ potencia la inactivación de ambas cepas de *Acanthamoeba* comparando con los tratamientos por separado (Apartados VI.2.3 y VI.2.5), lo cual, concuerda con estudios previos realizados frente a *E. coli*, coliformes fecales totales, *Enterococcus*, *Legionella jordanis*, *Pseudomonas aeruginosa*, virus MS2, colifagos somáticos, bacteriófagos de ARN F-específicos, *Fusarium solani* y *Fusarium equiseti* (Adeel y col., 2024; Agulló-Barceló y col., 2013; Martínez-García y col., 2023; Moreira y col., 2018; Polo-López y col., 2011, 2017; Sichel y col., 2009). De hecho, la inactivación total de la *Acanthamoeba* P31 se logra con todas las dosis de peróxido evaluadas, mientras que el tratamiento de $RS_{280-800\text{ nm}}$ por sí sólo no lo consigue (Apartado VI.2.5). Estos resultados son similares a los obtenidos mediante la combinación de cloro y RS (Apartado VI.3.1): la combinación puede inactivar la *Acanthamoeba*, pero sólo la RS, no.

Al combinar 1 mM de H_2O_2 (34 mg/L) y $RS_{280-800\text{ nm}}$, el tiempo y la dosis de RS necesarios para inactivar las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 se reduce en torno a 3 veces comparando con el tratamiento de $RS_{280-800\text{ nm}}$ (de 300 y más de 900 KWs/m² a 75 y 300 KWs/m², respectivamente).

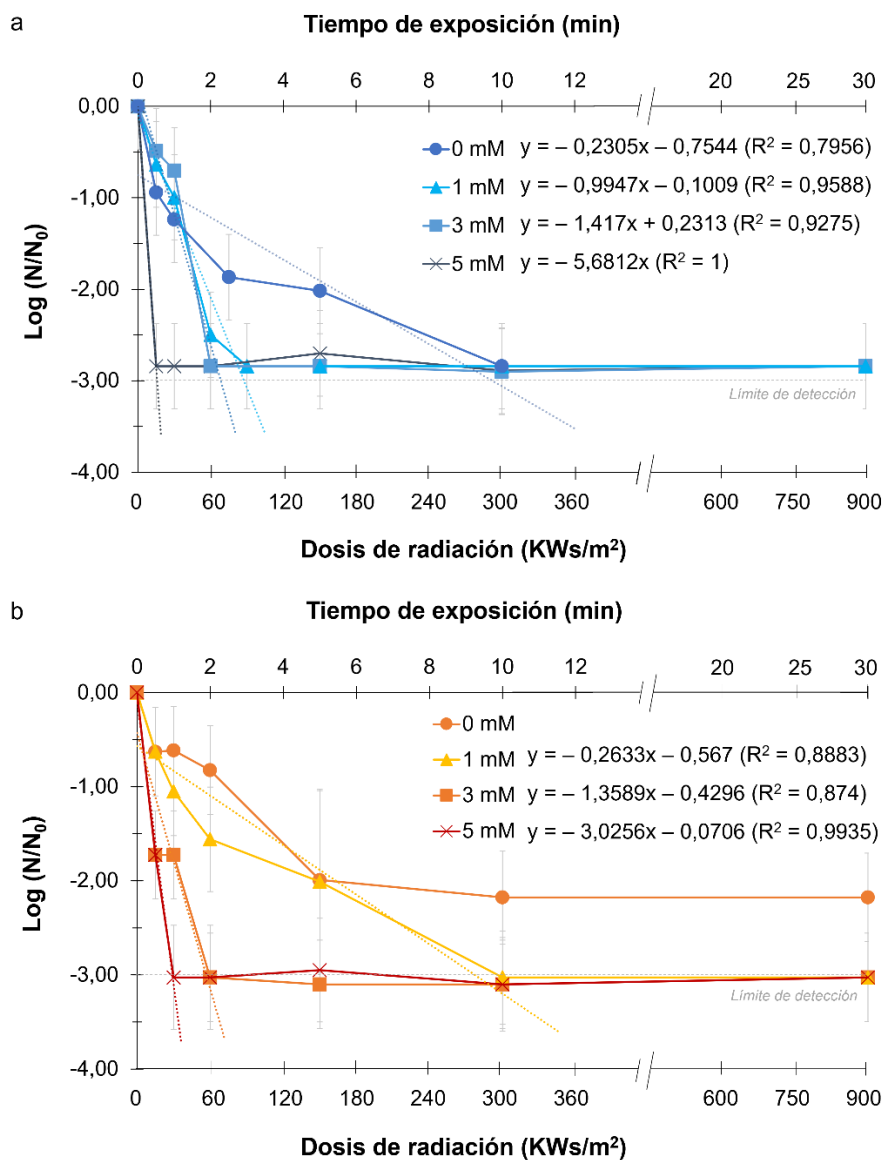


Figura VI.13. Inactivación de las *Acanthamoeba* (a) C1-211 y (b) P31 a lo largo de los tratamientos de RS y H₂O₂/RS con diferentes dosis de H₂O₂ (mM).

Tabla VI.20. Dosis de RS_{280-800 nm} (D, en KWs/m²) para lograr la inactivación de 2 log (99 %) y 3 log (99,9 %) de *Acanthamoeba* y para inactivar completamente las BE en los tratamientos de combinación H₂O₂/RS_{280-800 nm}.

TRATAMIENTO	C1-211			P31		
	D _{99%}	D _{99,9%}	D _{BE}	D _{99%}	D _{99,9%}	D _{BE}
1 mM H ₂ O ₂ /RS	57,3	87,4	900	163,3	277,2	900
3 mM H ₂ O ₂ /RS	47,2	68,6	300	34,7	56,7	900
5 mM H ₂ O ₂ /RS	10,6	15,8	150	19,1	29,0	150

Al combinar 3 mM de H₂O₂ (102 mg/L) y RS_{280-800 nm}, el tiempo y la dosis de RS necesarios para inactivar la *Acanthamoeba* P31 se reduce drásticamente 5 veces (60 W/m²) comparando con la dosis anterior (1 mM). En el caso de la *Acanthamoeba* C1-211, sin embargo, la combinación de

3 mM H₂O₂/RS_{280-800 nm} mantiene el tiempo y la dosis de RS_{280-800 nm} necesarias para inactivar la ameba. Al aumentar la dosis a 5 mM H₂O₂ (170 mg/L), el tratamiento H₂O₂/RS_{280-800nm} reduce 4 y 2 veces la dosis de radiación necesaria para inactivar las *Acanthamoeba* C1-211 y P31, respectivamente, comparando con la dosis anterior (3 mM).

Comparando con el tratamiento de RS_{280-800 nm}, **la combinación de 5 mM H₂O₂ y RS_{280-800 nm} acelera** pronunciadamente **la inactivación** de ambas cepas de *Acanthamoeba*: C1-211 y P31 se inactivaron totalmente **20 y 30 veces más rápido**, reduciendo la dosis de RS_{280-800 nm} necesaria (15 y 30 KWs/m²), respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Polo-López y col. (2017) y Martínez-García y col. (2023). En dichos estudios, los tratamientos de H₂O₂/RS_{natural} con dosis de 0,3 mM y 0,03 mM reducían 3 y >20 veces la exposición de RS necesaria para inactivar *L. jordanis* y el virus MS2, en comparación con el tratamiento de RS, y al aumentar a 1,5 mM y 0,15 mM H₂O₂, la inactivación se potenciaba hasta reducir 6 y 100 veces el tiempo de exposición necesario, respectivamente. Mamane y col. (2007) evaluó la inactivación de diferentes virus y *E. coli* mediante H₂O₂/UV_{λ>295 nm} y también observó que la inactivación aumentaba al incrementar la dosis inicial de H₂O₂, tal y como ocurre en el presente trabajo.

Tabla VI.21. Concentración residual de H₂O₂ (mM) tras los tratamientos de H₂O₂/SR_{280-800 nm} a diferentes dosis de H₂O₂.

TIEMPO (min)	C1-211				P31			
	DOSIS DE H ₂ O ₂ (mM)				DOSIS DE H ₂ O ₂ (mM)			
	1	3	5	10	1	3	5	10
0	1,0	3,0	5,0	10,0	1,0	3,0	5,0	10,0
2,5	0,9	2,9	4,9	9,7	1,5	1,6	6,0	8,8
5	0,9	2,8	4,8	9,3	1,4	1,5	5,0	9,8
10	0,9	2,9	4,9	10,3	1,0	1,4	5,0	9,9
30	1,1	2,8	5,5	11,1	1,4	1,6	5,7	10,9

3.4. INACTIVACIÓN DE BACTERIAS ENDOCITOBIONTES MEDIANTE COMBINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y RADIACIÓN SOLAR

Para determinar la efectividad de inactivación de los tratamientos de combinación de H₂O₂ con RS_{280-800 nm} frente a las BE protegidas por las AVL de estudio, se determina la supervivencia de las bacterias cualitativamente a lo largo de exposiciones a diferentes dosis de peróxido (de 1 a 25 mM) durante 30 minutos de RS_{280-800 nm}. La supervivencia de las BE se recoge en la Figura VI.14 y, las dosis de RS necesarias para inactivarlas completamente, en la Tabla VI.20.

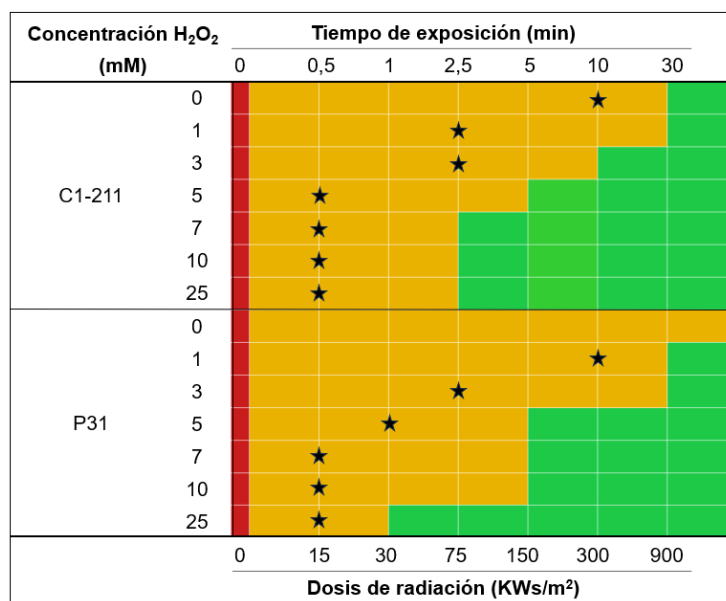


Figura VI.14. Inactivación de las BE de las *Acanthamoeba* C1-211 y P31 tras los tratamientos de RS y H₂O₂/RS_{280-800 nm}. La supervivencia de las BE se determina cualitativamente y se indica según los colores: rojo para la supervivencia de las BE no afectadas, naranja para la supervivencia de las BE afectada y verde para la inactivación completa de las BE. Las estrellas negras indican el tiempo y la dosis de RS necesarios para inactivar las correspondientes cepas de *Acanthamoeba* a las diferentes dosis de H₂O₂ evaluadas (mM).

Al combinar 1 mM de H₂O₂ (34 mg/L) y RS_{280-800 nm}, apenas se mejora la inactivación de las BE comparando con sólo RS_{280-800 nm} ($D_{BE} = 900 \text{ KWs/m}^2$). Al combinar 3 mM de H₂O₂ y RS_{280-800 nm}, se reducen 3 veces el tiempo y la dosis de RS necesarios para inactivar las BE de la *Acanthamoeba* C1-211, mientras que no se obtiene ninguna mejora en el caso de las BE de la *Acanthamoeba* P31. Al aumentar la dosis de H₂O₂ a 5 mM, la inactivación de las BE de ambas amebas se acelera pronunciadamente, resultando el proceso 6 veces más rápido que mediante el tratamiento de RS_{280-800 nm} individual (150 KWs/m² para las BE de ambas *Acanthamoeba*).

Estos resultados (Figura VI.14) sugieren que a concentraciones de 1 mM o 3 mM H₂O₂/RS_{280-800 nm} para las *Acanthamoeba* C1-211 y P31, respectivamente, los mecanismos de inactivación no logran atacar las BE. Sin embargo, dosis mayores de H₂O₂ incrementan la eficacia hasta el punto de causar la inactivación completa de las BE, coincidiendo esta tendencia con la observada en las *Acanthamoeba* (Apartado VI.3.3).

Hay evidencias de que existe un efecto sinérgico entre la RS_{280-800 nm} y el H₂O₂. La alta efectividad del tratamiento H₂O₂/RS_{280-800 nm} puede deberse a la combinación de múltiples mecanismos que acumulan daños celulares e inactivan las AVL y BE del presente estudio: (1) el daño interno y externo provocado por el H₂O₂, (2) el daño directo e indirecto provocado por la RS_{280-800 nm}, (3) el daño producido por los radicales [•]OH formados mediante la fotólisis de H₂O₂, pese a que

deben de ser menores que los producidos en tratamientos de H_2O_2 /UV-C, y (4) las reacciones (foto-)Fenton que ocurren tras la liberación de iones de hierro, cuando los clústeres y proteínas con hierro sufren daño directo por la radiación UV e indirecto por las ROS (Giannakis y col., 2016; Maniakova y col., 2021; Polo-López y col., 2011). De hecho, en todos estos mecanismos se forman ROS muy reactivas, especialmente $\cdot\text{OH}$, que es responsable de iniciar las cascadas de reacciones citotóxicas de radicales libres que dañan el ADN, las proteínas y los lípidos. El aumento de temperatura también puede promover la inactivación microbiana durante el proceso H_2O_2 /RS_{280-800 nm} (Polo-López y col., 2011), pero bajo las condiciones experimentales empleadas, no se considera que este mecanismo esté involucrado ya que la temperatura se mantuvo controlada hasta 30 °C a lo largo de los tratamientos.

Además, algunas reacciones que ocurren intra- y extra- celularmente pueden retroalimentarse y, bajo la luz solar, los sistemas de regulación de H_2O_2 como las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) pueden dañarse, provocando una sobreacumulación de H_2O_2 (García-Gil y col., 2022) que podría ser liberado una vez que la ameba y/o bacterias se dañen, aumentando los niveles extracelulares de peróxido. Esto explicaría el descenso inicial, pero posterior aumento, de la concentración residual de peróxido registrada, la cual, supera en ocasiones la concentración inicial (Tabla VI.21). Sería necesario llevar a cabo estudios fundamentales, así como análisis ultraestructurales similares a los realizados por He y col. (2021) y Wang y col. (2023a), para comprender mejor los mecanismos de inactivación por el tratamiento H_2O_2 /RS_{280-800 nm} y optimizar posteriormente las condiciones de desinfección.

Al aumentar la dosis a 7 mM H_2O_2 , se reduce el tiempo necesario para inactivar las BE de la *Acanthamoeba* C1-211, pero este se mantiene constante pese a aumentar más la dosis de H_2O_2 . En el caso de la *Acanthamoeba* P31, el tiempo necesario para inactivar las BE permanece constante a dosis mayores a 5 mM; no obstante, al utilizar dosis de 25 mM, el tiempo requerido para lograr la inactivación de las BE se reduce a 1 minuto. El hecho de que a concentraciones iguales o superiores a 7 mM (238 mg/L) apenas mejore la inactivación puede deberse al efecto de saturación del H_2O_2 , mientras que, si disminuyera la eficacia de inactivación, podría deberse al efecto quelante del H_2O_2 (Malato y col., 2009). Ambos efectos se han observado en estudios previos en los que se combina H_2O_2 y RS. Por un lado, Polo-López y col. (2011) y Agulló-Barceló y col. (2013) observaron que la inactivación de *Fusarium solani* y de *E. coli*, bacteriófagos ARN F-específicos, colífagos somáticos y clostridios reductores de sulfito era la misma a 15 y 10 mg/L, y a 20 y 50 mg /L, respectivamente, debido al efecto de saturación. Por otro lado, Adeel y col. (2024) observaron el efecto quelante al evaluar la inactivación de *E. coli* mediante H_2O_2 /RS: dosis

de 40 mg/L (1,2 mM) de H₂O₂ mejoraron la inactivación comparando con la RS, mientras que dosis de 90 mg/L (2,6 mM), la disminuyeron.

Considerando el efecto de saturación y los resultados, un tratamiento de desinfección de 5 mM H₂O₂/RS (170 mg/L) durante 5 minutos ($D = 150 \text{ KWs/m}^2$) es efectivo frente a ambas *Acanthamoeba* y sus BE. Comparando con otros estudios, se ha observado que tratamientos de H₂O₂/RS con dosis inferiores (entre 1 y 50 mg/l de H₂O₂, esto es, entre 0,03 y 1,5 mM) son eficientes frente a bacterias, fagos y algunas especies de hongos (Adeel y col., 2024; Agulló-Barceló y col., 2013; Martínez-García y col., 2023; Polo-López y col., 2011, 2017; Sichel y col., 2009); sin embargo, no fueron eficientes frente a microorganismos más resistentes como esporas de *B. subtilis*, esporas de *Clostridium perfringens* u ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Abeledo-Lameiro y col., 2016; Lanao y col., 2010; Mamane y col., 2007). Por tanto, sería interesante evaluar el poder desinfectante del tratamiento H₂O₂/RS_{280-800 nm} frente a estos microorganismos, empleando las dosis de H₂O₂ que han demostrado ser eficientes en este estudio.

4. INFLUENCIA DEL ORIGEN DE LA CEPA DE ACANTHAMOEBA EN LA EFECTIVIDAD DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN, APLICACIONES, CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Influencia del origen de la cepa de *Acanthamoeba*

Los resultados muestran diferencias en la resistencia a la desinfección entre las amebas de vida libre (AVL) estudiadas. Varios estudios previos también describen variaciones en la resistencia a desinfectantes entre diferentes géneros y cepas amebianas. Estas diferencias normalmente están relacionadas con diferencias en la composición de la pared quística y el espesor de sus capas, parámetros que pueden variar dependiendo de las cepas de AVL, pero también de las condiciones de cultivo y condiciones ambientales (Dupuy et al., 2014; Garajová y col., 2019).

El hábitat del que proceden las AVL también puede influir en la resistencia a desinfectantes, debido a su adaptación a diferentes condiciones ambientales. Dado que la *Acanthamoeba* P31 es una cepa que ya ha superado varios tratamientos de desinfección y habita en una piscina descubierta, donde está constantemente expuesta a la radiación solar y la presencia de cloro, cabe esperar que sea más resistente a todos los tratamientos evaluados. La mayor resistencia al Cl_2 puede estar relacionada con la constante presencia de este compuesto en la piscina en la que la *Acanthamoeba* P31 habita y de la que se aisló. En cuanto a la radiación solar, ambas amebas se aislaron de muestras expuestas a radiación, sin embargo, las diferencias encontradas en los resultados relacionados con este tratamiento pueden deberse a la menor turbidez de la piscina descubierta en la que habita la *Acanthamoeba* P31 comparado con el río donde habita la *Acanthamoeba* C1-211. Como en las aguas naturales hay partículas en suspensión y agregados microbianos que pueden causar turbidez y dispersar la radiación UV del sol (Environmental Protection Agency, EPA, 1999), la *Acanthamoeba* C1-211 podría estar menos expuesta a la radiación solar directa.

Como la *Acanthamoeba* P31 es más resistente a los tratamientos de Cl_2 y RS, cabe esperar que también sea más resistente a su combinación. Además, la *Acanthamoeba* P31 también es más resistente que la *Acanthamoeba* C1-211 a los tratamientos de H_2O_2 y $\text{H}_2\text{O}_2/\text{RS}$. Dado que el cloro, cuando se irradia con radiación solar, produce $\cdot\text{OH}$ entre otras especies reactivas (Chauque y Rott, 2021), cabe esperar que esta ameba esté adaptada a la exposición y ataques de estos radicales en la piscina descubierta que habitaba y, por ende, que sea también más resistente a los tratamientos en los que los radicales $\cdot\text{OH}$ forman parte de los mecanismos de inactivación.

Estos resultados, aunque se basen en la comparación de solamente dos cepas de *Acanthamoeba*, concuerdan con los obtenidos por Coulon y col. (2010); en dicho estudio, observaron que las cepas que ya han superado tratamientos de agua son más resistentes que las cepas que no (como las aisladas de agua de río). Lo que resulta preocupante es que, **cuanto más resistente es la cepa de *Acanthamoeba*, mayores son las dosis de desinfectante necesarias para inactivar sus bacterias endocitobiontes.**

El papel de *Acanthamoeba* como protector de microorganismos endocitobiontes

Como norma, los resultados muestran que la exposición a dosis que comprometen la supervivencia de las *Acanthamoeba* no es suficiente para inactivar sus bacterias endocitobiontes (BE). **Las BE sobreviven incluso habiéndose inactivado totalmente las amebas que las contienen**, demostrando que **las estas confieren una gran protección a los microorganismos de su interior**. Como hipótesis, se propone que las BE mueren (a) una vez que salen fuera de los trofozoítos o quistes inmaduros muertos o lisados o (b) una vez que el desinfectante (ya sea Cl₂, H₂O₂, *OH, otros ROS, RCS y/o la RS) alcanza la bacteria en el interior de la *Acanthamoeba*. En este último caso, la eficiencia del desinfectante dependería (entre otros factores) de la localización de las BE, ya que pueden estar distribuidas en diferentes compartimentos dentro de la ameba, como en las vacuolas o entre las paredes del endoquiste y ectoquiste (Greub y Raoult, 2004).

Ha de tenerse en cuenta que, para facilitar la visualización de los resultados de desinfección, es necesario emplear bacterias endocitobiontes de referencia. En el presente estudio se toman como referencia las BE capaces de crecer rápidamente en un medio nutritivo y atmósfera aerobia; sin embargo, *Acanthamoeba* puede transportar bacterias que no crecen en las condiciones empleadas en este estudio o que son incluso no cultivables (Greub y Raoult, 2004). También ha de considerarse que, al igual que las BE requieren dosis de desinfectante mayores que la propia ameba protectora para inactivarse completamente, otros organismos protegidos en el interior de las amebas también pueden requerirlas. En este sentido, merece la pena recordar que las AVL pueden transportar una gran variedad de microorganismos potencialmente patógenos que incluyen bacterias, levaduras, virus, inclusive el SARS-CoV-2, y hongos (Dey y col., 2022; Greub y Raoult, 2004). Por ello, es necesario llevar a cabo futuros estudios de desinfección sobre otros microorganismos susceptibles de ser protegidos por amebas. De esta manera, se tendría una visión más completa y holística de su papel protector y como “caballo de Troya”.

Además, conocer los mecanismos de desinfección que realmente ocurren durante la inactivación de las *Acanthamoeba* y, especialmente, durante la inactivación de los microorganismos que protege en su interior, permitiría dilucidar posibles tratamientos alternativos y/o complementarios. En este sentido, sería de gran aportación realizar ensayos fundamentales combinados con evaluación mediante microscopía electrónica como se ha realizado en otros estudios (He y col., 2021; Wang y col., 2023a).

Aplicación de los resultados obtenidos

Atendiendo a los resultados, el agua dulce (de río) o el agua regenerada puede contener amebas similares a la *Acanthamoeba* C1-211 que, como se ha visto en los resultados, pueden ser muy resistentes a tratamientos convencionales y alcanzar fácilmente sistemas de agua artificiales. Allí, las BE que las amebas portan en su interior pueden salir de estas y colonizar sistemas de distribución e instalaciones, suponiendo una amenaza para la salud de las personas expuestas. Si, además, se realizan tratamientos posteriores ineficaces contra las amebas, como la cloración en piscinas, se seleccionan las cepas más resistentes, las cuales colonizarán el sistema (como la *Acanthamoeba* P31) y harán extremadamente difícil la desinfección futura. Esto podría provocar brotes recurrentes de patógenos como *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* o de bacterias resistentes y multirresistentes a antibióticos (Muchesa y col., 2019; Nisar y col., 2022; Sarink y col., 2020). Además, con el incremento de la reutilización de agua en los últimos años (Alcalde-Sanz y Gawlik, 2014), para lo que suelen emplearse procesos que no inactivan estos organismos, *Acanthamoeba* y sus BE pueden volverse recalcitrantes en el ciclo urbano del agua.

Por tanto, dependiendo del uso posterior del agua, sería necesario aplicar un tratamiento capaz de inactivar amebas ambientales de agua dulce y sus bacterias endocitobiontes como medida de prevención. De hecho, si se establecieran tratamientos de desinfección eficientes para amebas en las estaciones potabilizadoras o como tratamientos terciarios en procesos de regeneración, las poblaciones de amebas en los sistemas acuáticos artificiales se reducirían. Dado que esto puede ser muy costoso y difícil de implementar para grandes caudales, sería conveniente desarrollar e instalar tratamientos más agresivos, capaces de inactivar las amebas y BE que ya han superado tratamientos de desinfección, en puntos específicos con menores caudales donde se expongan al agua personas de mayor riesgo, como hospitales o centros de tercera edad.

En este sentido, los procesos avanzados de oxidación (PAO) evaluados han demostrado ser **estrategias de desinfección eficaces** frente a estos microorganismos que, al poder llevarse a cabo bajo radiación UV a longitudes de onda características de la luz solar, pueden reducir enormemente el coste del tratamiento y el impacto medioambiental (Pichel y col., 2019).

La combinación de $\text{Cl}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ parece ser un tratamiento interesante para emplear en el punto de aplicación o consumo, ya que ambos agentes desinfectantes, cloro y radiación solar, son los más extendidos y utilizados a nivel mundial. Esto es especialmente relevante en áreas en vías de desarrollo, donde mejorarían la protección frente a otros patógenos (Chauque y col., 2021; Forsyth y col., 2013). Sin embargo, se ha de considerar la materia orgánica disuelta (MOD) ya que promueve la formación de subproductos perjudiciales para la salud cuando reacciona con cloro, lo cual, determinaría la viabilidad de este proceso. En este sentido, este tratamiento sería más apropiado para aguas con bajos niveles de MOD (Forsyth y col., 2013; Zhou y col., 2014), aunque sería necesario realizar estudios adicionales que consideraran esta materia.

Por otro lado, y atendiendo a los resultados, un tratamiento de desinfección que consistiera en la aplicación de 5 mM de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$ durante 5 minutos podría desinfectar eficaz y eficientemente tanto agua dulce como urbana. A diferencia del cloro, este tratamiento no genera subproductos carcinogénicos ya que el H_2O_2 se descompone en última instancia en H_2O y O_2 (Casini y col., 2017). No obstante, sería recomendable llevar a cabo procesos de optimización para definir dosis y tiempos de exposición más adecuados y mejor adaptados que, además, consideraran las concentraciones residuales según su uso posterior (Tabla VI.21).

Teniendo en cuenta que la radiación solar hace que esta tecnología sea una opción limpia, sostenible y económica (EPA, 1999), las ventajas de este proceso hacen que la combinación de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{SR}_{280-800 \text{ nm}}$ sea un **proceso de desinfección muy atractivo** y una vía de investigación prometedora para la desinfección del agua y el **control** de las infecciones causadas por BE, como la legionelosis.

Consideraciones y estudios futuros

Los resultados obtenidos subrayan la importancia de la **prevención** en materia de calidad de aguas y la **adaptación de los requisitos e indicadores microbiológicos** de los procesos de desinfección **en función del origen y destino del agua**. Las regulaciones desempeñan un papel clave en la protección de la salud y prevención de posibles infecciones y brotes. Sin embargo, las AVL son microorganismos olvidados u omitidos en las normativas relacionadas con los usos

del agua, a pesar de que tanto ellas como sus BE pueden suponer un riesgo para la salud (Thomas y col., 2010). Por ejemplo, las regulaciones en países como España, Grecia e Italia permiten la reutilización del agua para torres de refrigeración y condensadores, pero no incluyen protozoos como indicadores microbiológicos de control (Alcalde-Sanz y Gawlik, 2014; Real Decreto 1620/2007). Estas instalaciones, al igual que hospitales, centros de salud, piscinas o spas, se colonizan frecuentemente por AVL, convirtiéndose en focos infecciosos de BE como *Legionella pneumophila* (Cateau y col., 2014; Fernández, 2014; Greub y Raoult, 2004). Este y otros escenarios representan un desafío para la salud pública y amenazan el cumplimiento del Objetivo de Desarrollo Sostenible número seis de la Agencia de Las Naciones Unidas (2015): “Seguridad hídrica”.

Considerando la ineficiencia de los tratamientos de desinfección vigentes y los resultados obtenidos, es necesario revisar los indicadores microbianos regulados para determinados usos del agua donde las *Acanthamoeba* y sus BE potencialmente patógenas pueden suponer un riesgo para la salud. Además, realizar estudios adicionales similares al presente permitiría optimizar un tratamiento de desinfección adecuado a diferentes orígenes y usos del agua. Sería también interesante evaluar la efectividad de los tratamientos aquí evaluados frente otras cepas de *Acanthamoeba*, otros géneros de AVL y distintos microorganismos endocitobiontes para optimizar las condiciones del tratamiento. Asimismo, es crucial considerar diversos factores como la matriz, la turbidez, la presencia de iones, de secuestradores y de materia orgánica. En este sentido, la metodología para la evaluación de la supervivencia e inactivación de amebas y sus BE establecida en el presente capítulo puede servir como referencia para futuras investigaciones.

5. PRINCIPALES CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO VI

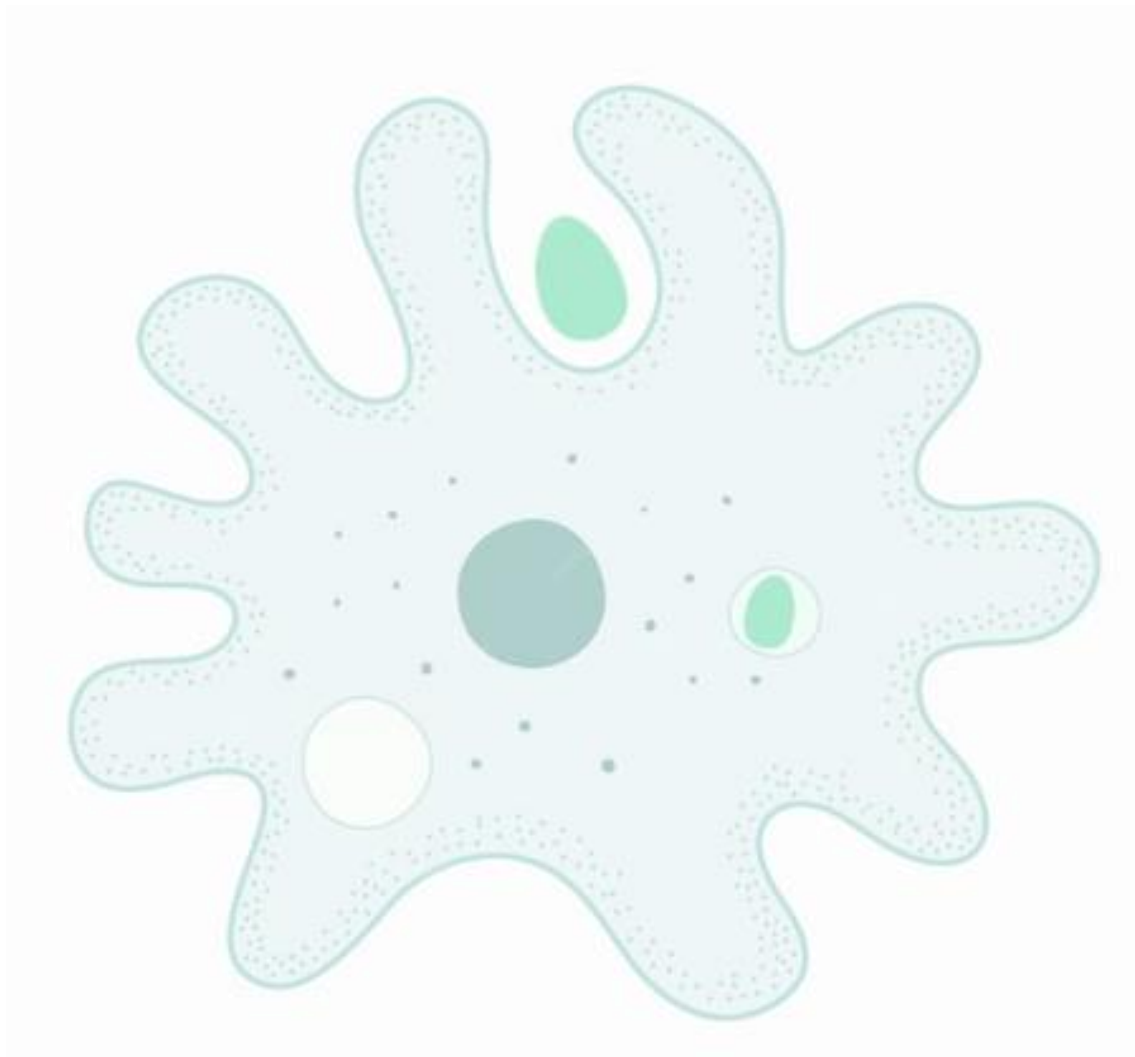
A continuación, y en base a los objetivos planteados (Capítulo II), se muestran las conclusiones del presente capítulo:

- El método del número más probable ha presentado las ventajas de tener un menor límite de detección, distinguir entre AVL viables y no viables y ser un proceso de observación fácil, frente al recuento en hemocitómetro, para la determinación de la inactivación de AVL.
- El método del análisis cualitativo ha presentado las ventajas de tener un menor límite de detección, ser replicable para las cepas de estudio y ser un proceso de valoración de la viabilidad fácil, frente al método del número más probable, para la determinación de la inactivación de BE.
- La inactivación de las BE requiere que, en primera instancia, se inactive la *Acanthamoeba* protectora, incrementando varias veces la dosis necesaria para lograr una desinfección eficiente y subrayando el rol protector de las amebas frente a los desinfectantes.
- El tratamiento de cloración, utilizando dosis de 500 mg/L Cl₂ durante 30 minutos, es capaz de inactivar la cepa de *Acanthamoeba* aislada de agua dulce y sus BE, pero no las BE de la *Acanthamoebea* procedente de la piscina descubierta.
- El tratamiento con H₂O₂, utilizando dosis de 25 mM durante 30 minutos, es capaz de inactivar tanto las amebas de estudio como las BE.
- La radiación solar UV-A (RS_{320-800 nm}) no fue efectiva inactivando ni las cepas de *Acanthamoeba* de estudio ni sus BE. La radiación solar UV-A + UV-B (RS_{280-800 nm}) fue capaz de inactivar la cepa de agua dulce y sus BE, pero no la cepa aislada de una piscina descubierta ni sus BE.
- La combinación de Cl₂ y RS_{320-800 nm} consigue la inactivación de la cepa de *Acanthamoeba* de agua dulce y sus BE, reduciendo 10 veces la dosis necesaria de Cl₂ respecto al tratamiento de cloración convencional, y la inactivación de la cepa de *Acanthamoeba* aislada de la piscina descubierta y sus bacterias, utilizando dosis de 500 mg/L Cl₂ durante 30 minutos de RS_{320-800 nm}.
- La combinación de Cl₂ y RS_{280-800 nm} resulta altamente eficiente para la inactivación de ambas cepas de *Acanthamoeba* y sus BE, reduciendo la dosis de Cl₂ necesaria entre 5 y 100 veces según su procedencia, respecto al tratamiento de cloración convencional.

- La combinación de H_2O_2 y $RS_{280-800\text{ nm}}$ resulta altamente eficiente para la inactivación de ambas cepas de *Acanthamoeba* y sus BE, reduciendo la dosis de H_2O_2 y de $RS_{280-800\text{ nm}}$ necesarios 5 y 6 veces, comparando con los respectivos tratamientos individuales.
- La cepa de *Acanthamoeba* aislada de una piscina descubierta, donde constantemente está expuesta a cloro y radiación solar, es más resistente que la cepa de agua dulce a todos los tratamientos evaluados, indicando que los tratamientos de desinfección convencionalmente utilizados seleccionan cepas resistentes que serán muy difíciles de eliminar en procesos posteriores. Estas cepas pueden volverse recalcitrantes en el ciclo urbano del agua y permitir la posible recolonización de instalaciones de agua, por las bacterias potencialmente patógenas transportadas en su interior.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES GENERALES

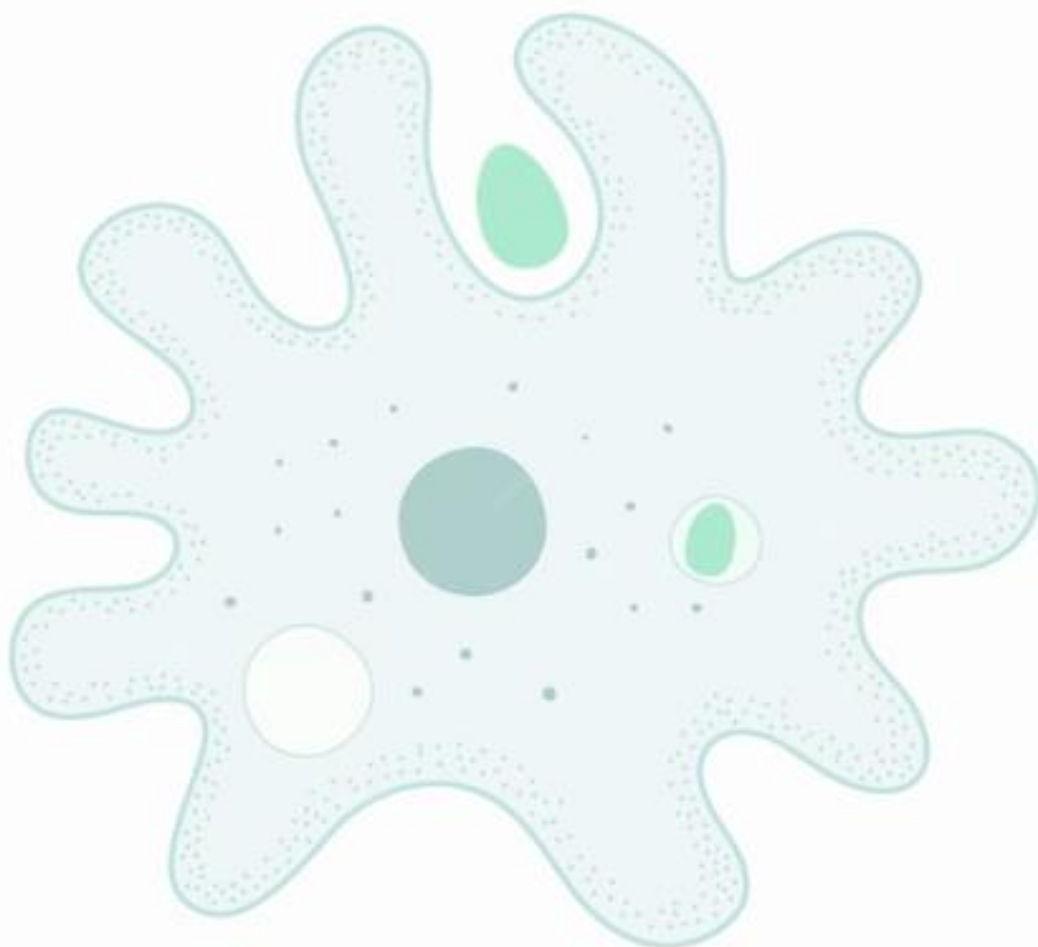


A continuación, se presentan las conclusiones generales de la presente Tesis Doctoral:

- Se han aislado amebas de vida libre (AVL) en todas las aguas superficiales de la Cuenca del Ebro analizadas, identificándose como *Acanthamoeba* genotipo T4 y *Naegleria*. El 65 % de las AVL son portadoras de bacterias endocitobiontes (BE), perteneciendo el 86 % de ellas a géneros potencialmente patógenos y subrayando el riesgo para la salud pública asociado al papel como vector de estos microorganismos.
- Se han aislado BE con multirresistencia a antibióticos en el 95 % de las AVL estudiadas, incluyendo resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos y quinolonas en toda la zona de estudio. La resistencia a otras familias de antibióticos se ha asociado a la localización geográfica.
- El 86 % de las AVL transporta y protege BERA con integrones de clases 1, 2 y 3, habiéndose caracterizado en ellos genes relacionados con resistencia a antibióticos, la formación de biofilm, virulencia, “quorum sensing”, motilidad, interacciones fitobióticas y vida intracelular, resaltando el papel de estos microorganismos como reservorio ambiental y potenciador de la diseminación de resistencias a antibióticos.
- Tanto la combinación de Cl_2 y $\text{RS}_{320-800 \text{ nm}}$, como la combinación de H_2O_2 y $\text{RS}_{280-800 \text{ nm}}$, resultan ser estrategias de desinfección más eficaces que los tratamientos convencionales por separado, variando la eficacia en función de la cepa de *Acanthamoeba* estudiada, con una alta influencia del origen de esta.
- En todos los casos se requieren mayores dosis de desinfectante para la inactivación de las BE al ser necesario inactivar previamente la *Acanthamoeba*, remarcando el papel protector de estos microorganismos.
- Los géneros de las BE con relevancia clínica identificados, la resistencia a antibióticos de uso ganadero en las BERA aisladas, los altos índices de multirresistencia encontrados y la elevada presencia de integrones de clase 1 sugieren un alto impacto de la ganadería en la microbiota y la ecología de los ecosistemas acuáticos, reflejando la influencia de estas actividades antropogénicas en la diseminación de bacterias potencialmente patógenas y (multi)resistentes a antibióticos a través de las amebas de vida libre.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA



Ab-Ag

- Abbas, F., Thomas, P., Cully-Duse, B., Andronicos, N.M., Winter, G. 2023. Cattle–compost–soil: The transfer of antibiotic resistance in livestock agriculture. *Microbiology Open* 12, e1375. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1375>
- Abbrescia, A., Palese, L.L., Papa, S., Gaballo, A., Alifano, P., Sardanelli, A.M. 2014. Antibiotic Sensitivity of *Bacillus clausii* Strains in Commercial Preparation. *Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs* 1 (2), 102–110. <https://doi.org/10.2174/2212707002666150128195631>
- Abdellah, Y.A.Y., Chen, H.Y., Sun, S.S., Yang, X., Luo, Y.S., Bello, A., Mohamed, T.A., Ren R.J., Li, W.T., Ahmed, R.M., Wang, R.L. 2023. Evaluating the impact of the humic acid amendment on antibiotic resistance genes reduction and product quality during swine manure composting. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 11, 110412. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110412>
- Abdullahi, I.N., Lozano, C., Simon, C., Latorre-Fernández, J., Zarazaga, M., Torres, C. 2023. Nasal staphylococci community of healthy pigs and pig-farmers in Aragon (Spain). Predominance and within-host resistome diversity in MRSA-CC398 and MSSA-CC9 lineages. *One Health* 16, 100505. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100505>
- Abeledo-Lameiro, M.J., Reboredo-Fernández, A., Polo-López, M.I., Fernández-Ibañez, P., Ares-Mazas, E., Gómez-Cousoa, H. 2016. Photocatalytic inactivation of the waterborne protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* using TiO₂/H₂O₂ under simulated and natural solar conditions. *Catalysis Today* 280, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.05.046>
- Adamski, P., Byczkowska-Rostkowska, Z., Gajewska, J., Zakrzewski, A.J., Klebukowska, L. 2023. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Bacillus* sp. Isolated from Raw Milk. *Microorganisms* 11 (4), 1065. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041065>
- Adan, C., Magnet, A., Fenoy, S., Pablos, C., Águila, C., Marugán, J. 2018. Concomitant inactivation of *Acanthamoeba* spp. and *Escherichia coli* using suspended and immobilized TiO₂. *Water Research* 144, 512–521. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.060>
- Adeel, M., Granata, V., Carapella, G., Rizzo, L. 2024. Effect of microplastics on urban wastewater disinfection and impact on effluent reuse: Sunlight/H₂O₂ vs solar photo-Fenton at neutral pH. *Journal of Hazardous Materials* 465, 133102. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133102>
- Adimpong, D.B., Sorensen, K.I., Thorsen, L., Stuer-Lauridsen, B., Abdelgadir, W.S., Nielsen, D.S., Derkx, P.M.F., Jespersen, L. 2012. African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis. *Applied Environmental Microbiology* 78, 7903–7914. <https://doi.org/10.1128/AEM.00730-12>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). 2019. *Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos 2019-2021*. Madrid (España): AEMPS. NIPO: 733-19-002-6.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). 2021. *España mantiene el pulso frente a la pandemia silenciosa: la resistencia a los antibióticos*. Madrid (España): AEMPS. Disponible en <https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/laAEMPS/2021/docs/NI-AEMPS-32-2021-antibioticos.pdf>
- Agencia Europea del Medicamento. 2023. *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022. Trends from 2010 to 2022. 13th ESVAC report*. Luxemburgo (Luxemburgo): Agencia Europea del Medicamento. ISBN 978-92-9155-071-5.

Ag-Am

- Agerso, Y., Jensen, L.B., Givskov, M., Roberts, M.C. 2002. The identification of a tetracycline resistance gene *tet(M)*, on a Tn916-like transposon, in the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiology Letters* 214, 251–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11355.x>
- Agerso, Y., Stuer-Lauridsen, B., Bjerre, K., Jensen, M.G., Johansen, E., Bennedsen, M., Brockmann, E., Nielsen, B. 2018. Antimicrobial susceptibility testing and tentative epidemiological cutoff values for five *Bacillus* species relevant for use as animal feed additives or for plant protection. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (19), e01108-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01108-18>
- Aguilar, S., Rosado, D., Moreno-Andres, J., Cartuche, L., Cruz, D., Acevedo-Merino, A., Nebot, E. 2018. Inactivation of a wild isolated *Klebsiella pneumoniae* by photo-chemical processes: UV-C, UV-C/H₂O₂ and UV-C/ H₂O₂/Fe³⁺. *Catalysis Today* 313, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.043>
- Agulló-Barceló, M., Polo-López, M.I., Lucena, F., Jofre, J., Fernández-Ibáñez, P. 2013. Solar Advanced Oxidation Processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: Implications for water reclamation. *Applied Catalysis B: Environmental*. 136-137. 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.01.069>
- Aibinu, I., Pfeifer, Y., Peters, F., Ogunsola, F., Adenipekun, E., Odugbemi, T., Koenig, W. 2012. Emergence of *bla*_{CTX-M-15}, *qnrB1* and *aac(6')-Ib-cr* resistance genes in *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter cloacae* from Nigeria (sub-Saharan Africa). *Journal of Medical Microbiology* 61 (1). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.035238-0>
- Aksozek, A., McClellan, K., Howardt, K., Niederkornt, J.Y., Alizadeh, H. 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* Cysts to Physical, Chemical, and Radiological Conditions. *Journal of Parasitology* 88 (3), 621-623. <http://www.jstor.org/stable/3285460>
- Alcalde-Sanz, L. y Gawlik, B.M. 2014. *Water Reuse in Europe. Relevant Guidelines, Needs for and Barriers to Innovation*. Luxemburgo (Luxemburgo): Publications Office of the European Union. ISBN 978-92-79-44399-2. <https://doi.org/10.2788/29234>
- Alcaraz, L.D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L.E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., Olmedo, G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
- Al-Hagar, O.E.A., Abol-Fotouh, D., Abdelkhalek, E.S., Elsoud, M.M.A., Sidkey, N.M. 2021. *Bacillus niabensis* OAB2: Outstanding bio-factory of selenium nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics* 273, 125147. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.125147>
- Alós, J.I. 2009. Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27 (5), 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.03.001>
- Amato, M., Dasí, D., González, A., Ferrús, M.A., Castillo, M.A. 2021. Occurrence of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in agricultural irrigation waters from Valencia city (Spain). *Agricultural Water Management* 256, 107097. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107097>

Am-Be

- Amenyogbe, E., Yang, E., Xie, R., Huang, J., Chen, G. 2022. Influences of indigenous isolates *Pantoea agglomerans* RCS2 on growth, proximate analysis, haematological parameters, digestive enzyme activities, serum biochemical parameters, antioxidants activities, intestinal morphology, disease resistance, and molecular immune response in juvenile's cobia fish (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 551, 737942. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737942>
- Anokyewaa, M.A., Amoah, K., Li, Y., Lu, Y., Kuebutornye, F.K.A., Asiedu, B., Seidu, I. 2021. Prevalence of virulence genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus* used in commercial aquaculture probiotics in China. *Aquaculture Reports* 21, 100784. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100784>
- Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Asadi, A., Abdi, M., Kouhsari, E., Panahi, P., Sholeh, M., Sadeghifard, N., Amirani, T., Ahmadi, A., Maleki, A., Gholami, M. 2020. Minocycline, focus on mechanisms of resistance, antibacterial activity, and clinical effectiveness: Back to the future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 22, 161-174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.022>
- Atencio, L., Rivera, J., Aranaga, V., Navarro, C., Guíñez, J. 2009. Caracterización de plásmidos y de la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Micrococcus* sp. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas (Universidad Del Zulia, Maracaibo, Venezuela)* 43 (1), 77–95.
- Aubry-Damon, H., Soussy, C.J., Courvalin, P. 1998. Characterization of Mutations in the *rpoB* Gene That Confer Rifampin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (10), 2590-2594. <https://doi.org/10.1128/aac.42.10.2590>
- Babosan, A., Fruchard, L., Krin, E., Carvalho, A., Mazel, D., Baharoglu, Z. 2022. Nonessential tRNA and rRNA modifications impact the bacterial response to sub-MIC antibiotic stress. *MicroLife* 3, 1–18. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqac019>
- Balczun, C. y Scheid, P.L. 2017. Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses* 9, 65. <https://doi.org/10.3390/v9040065>
- Bansal, K., Kumar, S., Patil, P.P., Sharma, S., Patil, P.B. 2022. Genomic data resource of type strains of genus *Pseudoxanthomonas*. *Data in Brief* 42, 108145. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108145>
- Bartholin, M.J., Vega, B.B., Silva, L.B. 2023. Antibiotic-Resistant Bacteria in Environmental Water Sources from Southern Chile: A Potential Threat to Human Health. *Microbiological Research* 14, 1764–1773. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040121>
- Beattie, T.K., Seal, D.V., Tomlinson, A., McFadyen, A.K., Grimason, A.M. 2003. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2992–3000. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2992-3000.2003>
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G. 2014. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 870-926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>

Be-Bo

Benito, M., Menacho, C., Chueca, P., Ormad, M.P., Goñi, P. 2020. Seeking the reuse of effluents and sludge from conventional wastewater treatment plants: Analysis of the presence of intestinal protozoa and nematode eggs. *Journal of Environmental Management* 261, 110268. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110268>

Berk, S.G., Gunderson, J.H., Newsome, A.L., Farone, A.L., Hayes, B.J., Redding, K.S., Udding, F., Williams, E.L., Johnson, R.A., Farsian, M., Reid, A., Skimmyhorn, J., Farone, M.B. 2006. Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environmental Science Technology* 40, 7440-7444. <https://doi.org/10.1021/es0604257>

Bernard, K. y Pacheco, A.L. 2015. In vitro activity of 22 antimicrobial agents against *Corynebacterium* and *Microbacterium* species referred to the Canadian National Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter* 37 (23), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.11.003>

Bertelli, C. y Greub, G. 2012. Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology* 2, 110. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00110>

Biswal, M., Gupta, P., Singh, C., Vig, S., Saini, P.S. 2023. Bacterial diversity of hospital water tanks and the efficacy of hydrogen peroxide based cleaning: Experience in a tertiary care center in India. *American Journal of Infection Control* 51, 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.05.011>

Biswas, R., Dutta, A., Dutta, D., Hazra, D., Banerjee, D.B., Basak, A., Das, A.K. 2015. Crystal structure of dehydratase component HadAB complex of mycobacterial FAS-II pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458, 369-374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.119>

Blue, S.R., Singh, V.R., Saubolle, M.A. 1995. *Bacillus licheniformis* bacteremia: Five cases associated with central venous catheters. *Clinical Infectious Diseases* 20, 629-633. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.3.629>

Bolam, D.N., Roberts, S., Proctor, M.R., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Davis, B.G., Davies, G.J., Gilbert, H.J. 2007. The crystal structure of two macrolide glycosyltransferases provides a blueprint for host cell antibiotic immunity. *Proceedings of National Academy of Sciences, U.S.A. (PNAS)*. 104 (13), 5336–5341. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607897104>

Bordeleau, E., Stogios, P.J., Evdokimova, E., Koteva, K., Savchenko, A., Wright, G.D. 2024. Mechanistic plasticity in ApmA enables aminoglycoside promiscuity for resistance. *Nature Chemical Biology* 20, 234–242. <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01483-3>

Borella, L., Salogni, C., Vitale, N., Scali, F., Moretti, V.M., Pasquali, P., Alborali, G.L. 2020. Motile aeromonads from farmed and wild freshwater fish in northern Italy: an evaluation of antimicrobial activity and multidrug resistance during 2013 and 2016. *Acta Veterinaria Scandinavica* 62, 6. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0504-y>

Bornier, F., Zas, E., Potheret, D., Laaberki, M.H., Coupât-Goutaland, B., Charpentier, X. 2021. Environmental Free-Living Amoebae Can Predate on Diverse Antibiotic-Resistant Human Pathogens. *Environmental Microbiology* 87 (18), e00747-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00747-21>

Bo-Ca

- Borovinskaya, M.A., Shoji, S., Fredrick, K., Cate, J.H.D. 2008. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA* 14, 1590-1599. <https://doi.org/10.1261/rna.1076908>
- Bosch, J. s.f. *Cálculo de errores y presentación de resultados experimentales*. Disponible en: <https://www.uv.es/jbosch/PDF/CalculoDeErrores.pdf>
- Bozdogan, B., Galopin, S., Gerbaud, G., Courvalin, P., Leclercq, R. 2003. Chromosomal *aadD2* Encodes an Aminoglycoside Nucleotidyltransferase in *Bacillus clausii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (4), 1343–1346. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1343-1346.2003>
- Branquinho, R., Pires, J., Amorim, M., Pintado, M.E., Peixe, L. 2015. *Antibiotic resistance and virulence profile of Bacillus pumilus group members* [póster]. FEMS 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, Países Bajos. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4771.8569>
- Brauge, T., Bourdonnais, E., Trigueros, S., Cresson, P., Debuiche, S., Granier, S.A., Midele, G. 2024. Antimicrobial resistance and geographical distribution of *Staphylococcus* sp. isolated from whiting (*Merlangius merlangus*) and seawater in the English Channel and the North Sea. *Environmental Pollution* 345, 123434. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123434>
- Büchner, P. 1953. *Endosymbiose der Tiere mit Pflanzlichen Mikroorganismen*. Basel (Suiza): Verlag Springer. ISBN: 978-3-0348-6959-1.
- Buck, S. y Rosenthal, R.A. 1996. A quantitative method to evaluate neutralizer toxicity against *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (9), 3521-3526. <https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3521-3526.1996>
- Buligina, T.V., Varbanec, L.D., Pasicnik, L.A., Zitkevic, N.V. 2016. Antibiotic Resistance of *Pantoea Agglomerans*. *Mikrobiologija i Biotehnologija* 1 (33), 68-75. ISSN 2076-0558. <https://doaj.org/article/3c97d0e5f23646b9875b61b0a3baaba3>
- Büttner, D. 2016. Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (6), 894–937. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw026>
- Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Zhang, L., Kay, P., Boxall, A., Hawkey, P.M., Wellington, E.M.H. 2011. Integron Prevalence and Diversity in Manured Soil. *Applied And Environmental Microbiology* 77 (2), 684–687. <https://doi.org/10.1128/AEM.01425-10>
- Cabello-Vílchez, A.M., Dávila-Barclay, A., Tsukayama, P. 2022. Isolation and Genomic Analysis of an Intracellular *Mycobacterium gordonae* from a Free-Living *Acanthamoeba* sp. in a Hospital Environment in Lima, Peru. *Microbiology Resource Announcements* 11 (11). <https://doi.org/10.1128/mra.00784-22>
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27 (1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Camargo, J.A. y Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32, 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Camiade M., Bodilis J., Chافتar N., Riah-Anglet W., Gardères J., Buquet S., Ribeiro, A.F., Pawlak, B. 2020. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from faecal wastes in the environment and contaminated surface water. *FEMS Microbiology Ecology* 96 (2), fiae008. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae008>

Ca-Ch

- Campista-León, S., López-Espinoza, J.U., García-Guerrero, J.T., Alfonso-Corrado, C., Clark-Tapia, R., Peinado-Guevara, L.I. 2022. Determination of drug-resistant bacteria in palmar surface and touchscreen cell phones from bystanders in an urban community. *Microbiological Research* 256, 126958. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126958>
- Cardas, M., Khan, N.A., Alsam, S. 2012. *Staphylococcus aureus* exhibit similarities in their interactions with *Acanthamoeba* and ThP1 macrophage-like cells. *Experimental Parasitology* 132, 513-518. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.014>
- Carstens, A., Bartie, C., Dennis, R., Bezuidenhout, C. 2014. Antibiotic-resistant heterotrophic plate count bacteria and amoeba-resistant bacteria in aquifers of the Mooi River, North West province, South Africa. *Journal of Water Health* 12.4, 835-845. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.226>
- Casini, B., Aquino, F., Totaro, M., Miccoli, M., Galli, I., Manfredini, L., Giustarini, C., Costa, A.L., Tuvo, B., Valentini, P., Privitera, G., Baggiani, A. 2017. Application of Hydrogen Peroxide as an Innovative Method of Treatment for *Legionella* Control in a Hospital Water Network. *Pathogens* 6 (15). <https://doi.org/10.3390/pathogens6020015>
- Casini, B., Baggiani, A., Totaro, M., Mansi, A., Costa, A.L., Aquino, F., Miccoli, M., Valentini, P., Bruschi, F., Lopalco, P.L., Privitera, G. 2018. Detection of viable but non-culturable *Legionella* in hospital water network following monochloramine disinfection. *Journal of Hospital Infections* 98, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.09.006>
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., Rodier, M.H., 2014. Free-living amoebae: What part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection* 87, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.001>
- Chauque, B.J.M., Benetti, A.D., Corção, G.; Silva, C.E., Gonçalves, R.F., Rott, M.B. 2021. A new continuous flow solar water disinfection system inactivating cysts of *Acanthamoeba castellanii*, and bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences* 20, 123-137. <https://doi.org/10.1007/s43630-020-00008-4>
- Chauque, B.J.M. y Rott, M.B. 2021. Photolysis of sodium chloride and sodium hypochlorite by ultraviolet light inactivates the trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii* in the water matrix. *Journal of Water Health* 19, 190–202. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.401>
- Chemotechnique Diagnostics. 2017. *Información para el paciente. Gentamicin sulfate*. Disponible en: <https://www.chemotechnique.se/>
- Chen, H., Chen, R., Jing, L., Bai, X., Teng, Y. 2019. A metagenomic analysis framework for characterization of antibiotic resistomes in river environment: Application to an urban river in Beijing. *Environmental Pollution* 245, 398-407. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.024>
- Chen, C.H., Huang, C.L., He, M.S., Huang, F.C., Lin, W.C. 2020. Characterisation of the β -lactam resistance enzyme in *Acanthamoeba castellanii*. *International Journal of Antimicrobials Agents* 55, 105823. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.004>
- Cho M., Kim J., Kim J.Y., Yoon J., Kim J.H. 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research*, 44, 3410-3418. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017>

Ch-Co

Chorost, M.S., Smith, N.C., Hutter, J.N., Ong, A.C., Stam, J.A., McGann, P.T., Hinkle, M.K., Schaecher, K.E., Kamau, E. 2018. Bacteraemia due to *Microbacterium paraoxydans* in a patient with chronic kidney disease, refractory hypertension and sarcoidosis. *JMM Case Reports* 5 (11). <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005169>

CIMAvet. 2024. *Medicamentos veterinarios*. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. V.3.2.1. Disponible en: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/quees.html>

Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 26 (3), 547-603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. CLSI guideline M45. 3ª Edición. Pensilvania (Estados Unidos): Clinical and Laboratory Standards Institute. ISBN 1-56238-917-3.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2020. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI supplement M100. 30ª Edición. Pensilvania (Estados Unidos): Clinical and Laboratory Standards Institute. ISBN 978-1-68440-066-9

Cobos-Trigueros, N., Ateka, O., Pitart, C., Vila, J. 2009. Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 27 (7), 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.002>

Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Stokes, H.W., Hall, R.M. 2002. Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines. *Journal Of Bacteriology* 184 (11), 3017–3026. <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.3017-3026.2002>

Comba-González, N.B., Chaves-Moreno, D., Vanegas, J.S., Montoya-Castano, D. 2024. A pan-genomic assessment: Delving into the genome of the marine epiphyte *Bacillus altitudinis* strain 19_A and other very close *Bacillus* strains from multiple environments. *Heliyon* 10, e27820. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27820>

Comisión Europea. 2017. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). Disponible en: https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf

Comisión Europea. 2022. *Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (versión refundida)*. Bruselas (Bélgica): Comisión Europea. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu>

Conco-Biyela, T., Malla, M.A., Awolusi, O.O., Allam, M., Ismail, A., Stenström, T.A., Bux, F., Kumari, S. 2024. Metagenomics insights into microbiome and antibiotic resistance genes from free living amoeba in chlorinated wastewater effluents. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 258, 114345. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2024.114345>

Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., Mendo, S., Duarte, A. 2003. Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (9), 2838-2843. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2838-2843.2003>

Corsaro, D., Pages, G.S., Catalan, V., Loret, J.F., Greub, G., 2010. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213 (3), 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.03.002>

Co-De

- Costa, S.S., Ferreira, C., Ribeiro, R., Fessler, A.T., Schink, A.K. Kadlec, K., Kaspar, H., Amaro, A., Albuquerque, T., Abrantes, P., Morais, C., Pomba, C., Schwarz, S., Couto, I. 2021. Proposal of Epidemiological Cutoff Values for Apramycin 15 mg and Florfenicol 30 mg Disks Applicable to *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance* 27 (1). <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0402>
- Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V. 2010. Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2689-2697. <https://doi.org/10.1128/JCM.00309-10>
- Cuthbertson, L. y Nodwell, J.R. 2013 The TetT Family of Regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (3), 440-475. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00018-13>
- Dalrymple, K., Stefanakos, W., Trotz, M.A., Goswami, D.Y. 2010. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental* 98, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.05.001>
- Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M.S., Alav, I., Webber, M.A., Blair, J.M.A. 2023. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature reviews microbiology* 21, 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Das, S., Meyer, I., Alaguvel, V., Ghazaryan, L., Murase, J., Shnerb, N., Gillor, O. 2023. Bacteriophagy of enteric bacteria by soil isolated amoeba depends on both temperature and salinity. *Geoderma* 439, 116691. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116691>
- De Jonckheere, J. F. 1982. Hospital hydrotherapy pools treated with ultra violet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria*. *Journal of Hygiene*. 88, 205- 214. <https://doi.org/10.1017/s0022172400070078>
- De Jonckheere, J.F. 2014. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology* 145, Suppl: S2-9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.011>
- De La Cruz, K.F., Townsend, E.C., Cheong, J.Z.A., Salamzade, R., Liu, A., Sandstrom, S., Davila, E., Huang, L., Xu, K.H., Wu, S.Y., Meudt, J.J., Shanmuganayagam, D., Gibson, A.L.F., Kalan, L.R. 2024. The porcine skin microbiome exhibits broad fungal antagonism. *Fungal Genetics and Biology* 173, 103898. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2024.103898>
- De la Rosa-Ramos, M.A., Salcedo-Hernandez, R., Sarmiento-Silva, R.E., Aguilera-Arreola, M.G., Alcantar-Curiel, M.D., Betanzos-Cabrera, G., Rodríguez-Martínez, S., Cancino-Díaz, M.E., Cancino-Díaz, J.C. 2021. Non-epidermidis coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from farm animals can inhibit the hemagglutinating activity of Newcastle disease virus and bovine parainfluenza virus type 3. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 76, 101649. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101649>
- DebMandal, M., Mandal, S., Pal, N.K. 2011. Antibiotic resistance prevalence and pattern in environmental bacterial isolates. *The Open Antimicrobial Agents Journal* 3, 45–52. <https://doi.org/10.2174/1876518101103010045>
- Declerck, P., Behets, J., Hoef, V., Ollevier, F. 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research* 41, 3159-3167. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.011>

De-Do

Deekshit, V.K. y Srikumar, S. 2022. 'To be, or not to be' —The dilemma of 'silent' antimicrobial resistance genes in bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 133, 2902–2914. <https://doi.org/10.1111/jam.15738>

Dégut, C., Roovers, M., Barraud, P., Brachet, F., Feller, A., Larue, V., Refaii, A.A., Caillet, J., Droogmans, L., Tisé, C. 2019. Structural characterization of *B. subtilis* m₁A²² tRNA methyltransferase Trmk: insights into tRNA recognition. *Nucleic Acids Research* 47 (9), 4736–4750. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz230>

Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., Héchard, Y., 2013. Microbiome of freeliving amoebae isolated from drinking water. *Water Research* 47, 6958–6965. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.047>

Delafont, V., Bouchon, D., Héchard, Y., Moulin, L. 2016. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Water Research* 100, 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.044>

Delafont, V., Rodier, M.H., Maisonneuve, E., Cateau, E. 2018. *Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest. *Microbial Ecology* 76 (4), 991–1001. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1199-8>

Delik, E., Eroglu, B., Tefon-Ozturk, B.E. 2024. Evaluation of the in vitro effects of concentrations of antibiotics on three Enterobacteriaceae isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40, 73. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03877-w>

Delumeau, A., Quérel, I., Harnais, F., Sellin, A., Gros, O., Talarmin, A., Marcelino, I. 2023. Bacterial microbiota management in free-living amoebae (*Heterolobosea* lineage) isolated from water: The impact of amoebae identity, grazing conditions, and passage number. *Science of the Total Environment* 900, 165816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165816>

Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., Yu, G. 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14, 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>

Dey, R., Dlusskay, E., Ashbolt, N.J. 2022. SARS-CoV-2 surrogate (Phi6) environmental persistence within free-living amoebae. *Journal of Water & Health* 20, 83. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.167>

Di Cesare, A., Corno, G., Manaia, C.M., Rizzo, L. 2020. Impact of disinfection processes on bacterial community in urban wastewater: Should we rethink microbial assessment methods? *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 104393. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104393>

Di Filippo, M.M., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D'Alfonso, R., Berrilli, F., Di Cave, D. 2015. Isolation and molecular characterization of freeliving amoebae from different water sources in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 3417–3427. <https://doi.org/10.3390/ijerph120403417>

Díaz, R., Gamazo, C., López-Goñi, I. 1995. *Manual práctico de Microbiología*. 3ª Edición. Barcelona (España): Masson, S.A. ISBN 84-458-0281-X.

Directiva del Consejo 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, 91/271/CEE, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 135 de 30 de mayo de 1991.

Do-El

- Doi, Y., Wachino, J.I., Arakawa, Y. 2016. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America* 30 (2), 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>
- Dominguez, E., Zarazaga, M., Torres, C. 2002. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* Isolates Obtained from Fecal Samples of Healthy Children. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7), 2638–2641. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2638-2641.2002>
- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8 (9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Drbohlavova, J., Rezanka, T., Kolouchova, I. 2019. Characterization of *Kocuria* sp. isolates from spa spring in Czech Republic. *Journal of Biotechnology* 305S, S33–S88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.147>
- Drozanski, W. y Drozanska, D. 1961. Dead bacteria as a food for Amoebae. *Acta Microbiologica Polonica* 10, 379–387. ISBN: 0001-6195.
- Dubey, G.P. y Ben-Yehuda, S. 2011. Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication. *Cell* 144, 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- Duchateau, S., Crouzet, J., Dorey 1, S., Aziz, A. 2024. The plant-associated *Pantoea* spp. as biocontrol agents: Mechanisms and diversity of bacteria-produced metabolites as a prospective tool for plant protection. *Biological Control* 188, 105441. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105441>
- Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec N., Herbelin, P., Ménard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M.H, Soreau, S., Wallet, F., Héchard, Y. 2011. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Research* 45, 1087-1094. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.025>
- Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M.H., Soreauc, S., Héchard, Y. 2014. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water Disinfectants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217, 335-339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007>
- Eady, E.A., Coates, P., Ross, I., Ratyal, A.H., Cove, J.H. 2000. Antibiotic resistance patterns of aerobic coryneforms and furazolidone-resistant Gram-positive cocci from the skin surface of the human axilla and fourth toe cleft. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 205-213.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Grennberg, A.E. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. 21ª Edición. Washington (Estados Unidos): American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. ISBN 0875530478.
- Edagawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Kusuhara, Y., Karanis, P. 2009. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitology Research* 105 (4), 1109–1117. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1528-4>
- El-Rhman, A.M.A., Khatta, Y.A.E., Shalaby, A.M.E. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas species* as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 27, 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020>

Em-Fa

Emamalipour, M., Seidi, K., Vahed, S.Z., Jahanban-Esfahlan, A., Jaymand, M., Majdi, H., Amoozgar, Z., Chitkushev, L.T., Javaheri, T., Jahanban-Esfahlan, R., Zare, P. 2020. Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. *Frontiers in Cell Development and Biology* 8, 229. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00229>

Enne, V.I., Livermore, D.M., Stephens, P., Hall, L.M. 2001. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 357, 1325–1328. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04519-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04519-0)

Environmental Protection Agency (EPA). 1983. *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. Washington D.C. (Estados Unidos): Office of Water. EPA 815-R-99-014. Disponible en: <https://www.epa.gov/>

Environmental Protection Agency (EPA). 1999. *Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*. Washington D.C. (Estados Unidos): Office of Water. EPA 815-R-99-014. Disponible en: <https://www.epa.gov/>

Erber, L., Betat, H., Mörl, M. 2020. CCA-Addition Gone Wild: Unusual Occurrence and Phylogeny of Four Different tRNA Nucleotidyltransferases in *Acanthamoeba castellanii*. *Molecular Biology and Evolution* 38 (3), 1006–1017. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa270>

Erickson, M.C., y Ortega, Y.R. 2006. Inactivation of Protozoan Parasites in Food, Water, and Environmental Systems. *Journal of Food Protection* 69 (11), 2786–2808. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.11.2786>.

Ettinger, M.R., Webb, S.R., Harris, S.A., McIninch, S.P., Garman, G.C., Brown, B.L. 2003. Distribution of free-living amoebae in James river, Virginia, USA. *Parasitology Research* 89, 6–15. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0707-3>

European Chemicals Agency. 2020. *Regulation (EU) 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Product Assessment Report of a Biocidal Product (Family) for National Authorisation Applications. Product types 2, 3, 4, 5 Hydrogen peroxide as included in the Union list of approved active substances*. Disponible en: <https://echa.europa.eu/documents/10162/1e1085f8-5cd7-e878-d79b-3ccd18ed0996>

European Commission. 1998. *Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Efficacy and Risk for Users of the Therapeutic Macrolides Antibiotics Tylosin and Spiramycin Used as Feed Additives*. Disponible en: https://food.ec.europa.eu/document/download/7b93f379-0397-44d3-b1ba-6efcf6612ea6_en

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2024. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 14.0, valid from 2024-01-01*. Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

Evstigneeva, A., Raoult, D., Karpachevskiy, L., La Scola, B. 2009. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 155, 657–664. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022970-0>

Exopol. 2022. *La etiología cunícola en estadísticas*. Disponible en: www.exopol.com

Faria, C., Vaz-Moreira, I., Serapicos, E., Nunes, O.C., Manaia, C.M. 2009. Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the Total Environment* 407, 3876–3882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.034>

Fe-Fo

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>

Fernández, M.T. 2014. *Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: Asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública*. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. ISSN 2254-7606.

Fernández-Cassi, X., Silvera, C., Cervero-Aragó, S., Rusiñol, M., Latif-Eugeni, F., Bruguera Casamada, C., Civit, S., Araujo, R.M., Figueras, M.J., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2016. Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 16816–16833. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6812-0>

Fernández-Fernández, R., Lozano, C., Reuben, R.C., Ruiz-Ripa, L., Zarazaga, M., Torres, C. 2023. Comprehensive Approaches for the Search and Characterization of Staphylococci. *Microorganisms* 11 (5), 1329. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051329>

Fernando, W.J.N. y Othman, R. 2006. Relevance of diffusion through bacterial spore coats/membranes and the associated concentration boundary layers in the initial lag phase of inactivation: A case study for *Bacillus subtilis* with ozone and monochloramine. *Mathematical Biosciences* 199 (2), 175-187.

Ferrand, J., Hadou, T., Selton-Suty, C., Goehringer, F., Sadoul, N., Alauzet, C., Lozniewski, A. 2013. Cardiac Device-Related Endocarditis Caused by *Paenibacillus glucanolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology* 51 (10), 3439–3442. <https://doi.org/10.1128/JCM.00864-13>

Fessler, A.T., Kadlec, K., Schwarz, S. 2011. Novel Apramycin Resistance Gene *apmA* in Bovine and Porcine Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 55 (1), 373–375. <https://doi.org/10.1128/AAC.01124-10>

Fierro, F. 2014. Electroforesis de ADN. En: A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, M.G. Rocha. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 2014. México D.F. (México): Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. ISBN. 978-607-8246-72-4.

Firoozeh, F., Mahluji, Z., Khorshidi, A., Zibaei, M. 2019. Molecular characterization of class 1, 2 and 3 integrons in clinical multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 8, 59. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0509-3>

Fluit, Ad. C., Rogers, M.R.C., Díez-Aguilar, M., Cantón, R., Benaissa-Trouw, B.J., Bayjanov, J.R., Ekkelenkamp, M.B. 2020. Draft genome sequence of the strain 16-537536, isolated from a patient with bronchiectasis and its relationship to the *Pseudomonas koreensis* group of the *Pseudomonas fluorescens* complex. *BMC research Notes* 13, 10. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4863-2>

Forsyth, J.E., Zhou, P., Mao, Q., Asato, S.S., Meschke, J.S., Dodd, M.C. 2013. Enhanced inactivation of *Bacillus subtilis* spores during solar photolysis of free available chlorine. *Environmental Science Technology* 47, 12976–12984. <https://doi.org/10.1021/es401906x>

Fowora, M.A., Omolopo, I.A., Aiyedogbon, A., Abioye, A., Oladele, O.E., Tajudeen, A.O., Ogunniyan, T., Olanlege, A.L., Onyeaghasiri, F.U., Edu-Muyideen, I.O., Iwalokun, B., Adegbola, R., Salako, B.L. 2023. Multidrug-Resistant *Kocuria rosea* and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Co-Infection in a Nigerian Patient with COVID-19: A Case Report. *American Journal of Case Reports* 24, e98761-1 – e98761-7. <https://doi.org/10.12659/AJCR.938761>

Fr-Ga

- Fresno, A.H., Zachariasen, C., Hansen, M.H., Nielsen, A., Hendriksen, R.S., Nielsen, S.S., Olsen, J.E. 2016. Apramycin treatment affects selection and spread of a multidrug resistant *Escherichia coli* strain able to colonize the human gut in the intestinal microbiota of pigs. *Veterinary Research* 47, 12. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0291-z>
- Fritsche, T., Sobek, D., Gautom, R. 1998. Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiology Letters* 166, 231–236. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13895.x>
- Fuentes, M.A.F., Morente, E.A., Abriouel, H., Pulido, R.P., Gálvez, A. 2014. Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide-resistant gram-negative bacteria from organic foods. *Food Control* 37, 9-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.041>
- Funke, G., Falsen, E., Barerau, C. 1995. Primary Identification of *Microbacterium* spp. Encountered in Clinical Specimens as CDC Coryneform Group A-4 and A-5 Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1), 188-192. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.1.188-192.1995>
- Furuta, Y., Tsujinouchi, M., Shawa, M., Zorigt, T., Miyajima, Y., Paudel, A., Suzuki, S., Higashi, H., Gill, S.R. 2022. Complete Genome Sequences of 24 Strains of *Bacillus cereus* Isolated from Nosocomial Infection and Bacteremia Cases in Japan. *Microbiology Resource Announcements* 11 (4), 14. <https://doi.org/10.1128/mra.01203-21>
- Gabriel, A.A. y Panaligan, D.C. 2020. Heat and chlorine resistance of a soil *Acanthamoeba* sp. cysts in water. *Journal of Applied Microbiology* 129, 453-464. <https://doi.org/10.1111/jam.14600>
- Galimand, M., Fishovitz, J., Lambert, T., Barbe, V., Zajicek, J., Mobashery, S., Courvalin, P. 2015. AAC(3)-XI, a new aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from *Corynebacterium striatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 5647–5653. <https://doi.org/10.1128/AAC.01203-15>
- Gao, L., Wang, L., Dai, T., Jin, K., Zhang, Z., Wang, S., Xie, F., Fang, P., Yang, B., Huang, H., van Dam, H., Zhou, F., Zhang, L. 2018. Tumor-derived exosomes antagonize innate antiviral immunity. *Nature Immunology* 19, 233–245. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0043-5>
- Garajová, M., Mrva, M., Vaskovicová, N., Martinka, M., Melicherová, J., Valigurová, A. 2019. Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. *Science Reports* 9, 4466. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>
- García, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., Abu Kwaik, Y. 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology* 9, 1267-1277. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01245.x>
- García, A., Goñi, P., Clavel, A., Lobez, S., Fernández, M.T., Ormad, M.P., 2011. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology Reports* 3, 622–626. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00271>
- García, A., Goñi, P., Cieloszyk, J., Fernández, M.T., Calvo Beguería, L., Rubio, E., Fillat, M.F., Peleato, M.L., Clavel, A. 2013. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. *Environmental Science Technology* 47, 3132. <https://doi.org/10.1021/es400160k>

Ga-Go

García, J., García-Galán, M.J., Day, J.W., Boopathy, R., White, J.E., Wallace, S., Hunter, R.G. 2020. A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology* 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>

García-Fernández, I., Polo-López, M.I., Oller, I., Fernández-Ibáñez, P. 2012. Bacteria and fungi inactivation using Fe³⁺/sunlight, H₂O₂/sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study. *Applied Catalyses B: Environmental* 121-122, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.03.012>

García-Gil, A., Feng, L., Moreno-SanSegundo, J., Giannakis, S., Pulgarín, C., Marugán, J. 2022. Mechanistic modelling of solar disinfection (SODIS) kinetics of *Escherichia coli*, enhanced with H₂O₂ – part 1: The dark side of peroxide. *Chemical Engineering Journal* 439, 135709. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135709>

Gelman, B.B., Rauf, S.J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H.W., Visvesvara, G.S., 2001. Amoebic Encephalitis Due to *Sappinia diploidea*. *Journal of the American Medical Association* 285, 2450–2451. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2450>

Giannakis, S., Polo, M.I., Spuhler, D., Sánchez, J.A., Fernández, P., Pulgarín, C. 2016. Solar disinfection is an augmentable, *in situ*-generated photo-Fenton reaction—Part 1: A review of the mechanisms and the fundamental aspects of the process. *Applied Catalysis B: Environmental* 199, 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.06.009>

Gillings, M.R. 2014. Integrins: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78 (2), 257–277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>

Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.G. 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9, 1269-1279.

Jimeno, O. y Ortega, C. 2005. *Antibioterapia y Salud Pública Veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos*. Évora (Portugal): Universidad de Évora. Disponible en: www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/antib_portugal.pdf

Gjermansen, M., Ragas, P., Tolker-Nielsen, T. 2006. Proteins with GGDEF and EAL domains regulate *Pseudomonas putida* biofilm formation and dispersal. *FEMS Microbiology Letters* 265 (2), 215–224, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00493.x>

Gneiding K., Frodl, R., Funke, G. 2008. Identities of *Microbacterium* spp. encountered in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (11), 3646-3652. <https://doi.org/10.1128/JCM.01202-08>

Goltermann, L., Andersen, K.L., Johansen, H.K., Molin, S., La Rosa, R. 2022. Macrolide therapy in *Pseudomonas aeruginosa* infections causes uL4 ribosomal protein mutations leading to high-level resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 28, 1594-1601. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.08.003>

Gomes, T.D.S., Magnet, A., Izquierdo, F., Vaccaro, L., Redondo, F., Bueno, S., Sánchez, M.L., Angulo, S., Fenoy, S., Hurtado, C., Águila, C. Del, 2016a. *Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154246>

Go-Gu

- Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M.J., Ruiz, J. 2016b. Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*: Focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology* 43 (1), 1–30. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261>
- Gomes, T.S., Vaccaro, L., Magnet, A., Izquierdo, F., Ollero, D., Martínez-Fernández, C., Mayo, L., Moran, M., Pozuelo, M.J., Fenoy, S., Hurtado, C., Del Águila, C. 2020. Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from Drinking Water Treatment Plants. *Science of the Total Environment* 719, 137080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137080>
- Gómez-Lus, R. 1998. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. *International Microbiology* 1, 279–284.
- Goñi, P., Vergara, Y., Ruiz, J., Albizu, I., Vila, J., Gómez-Lus, R. 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 268–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.07.016>
- Goñi, P., Fernández, M.T., Rubio, E. 2014. Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae. *Environmental Microbiology* 16 (2), 339–349. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12363>
- González, O., Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A.L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., Campos-García, J. 2017. Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host. *Microbial Ecology* 73 (3), 616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>
- González-Villalobos, E., Ribas-Aparicio, R.M., Belmont-Monroy, L., Aparicio-Ozores, G., Manjarrez-Hernández, H.A., Gavilanes-Parra, S., Balcázar, J.L., Molina-López, J. 2022. Identification and characterization of class 1 integrons among multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains in Mexico. *Microbial Pathogenesis* 162, 105348. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105348>
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.C. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories* 15, 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Greub, G. y Raoult, D. 2004. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* 17 (2), 413–433. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
- Grinter, R., Hay, I.D., Song, J., Wang, J., Teng, D., Dhanesakaran, V., Wilksch, J.J., Davies, M.R., Littler, D., Beckham, S.A., Henderson, I.R., Strugnell, R.A., Dougan, G., Lithgow, T. 2018. FusC, a member of the M16 protease family acquired by bacteria for iron piracy against plants. *PLoS Biology* 16 (8), e2006026. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006026>
- Grosse, C., Grau, J., Grosse, I., Nies, D.H. 2022. Importance of RpoD- and Non-RpoD-Dependent Expression of Horizontally Acquired Genes in *Cupriavidus metallidurans*. *Microbiology Spectrum* 10 (2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00121-22>
- Gu, Y., Ma, Y.N., Wang, J., Xia, Z., Wei, H.L. 2020. Genomic insights into a plant growth-promoting *Pseudomonas koreensis* strain with cyclic lipopeptide-mediated antifungal activity. *Microbiology Open* 9, e1092. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1092>

Gu-He

- Gua, G., Ottesen, A., Bolten, S., Luo, Y., Rideout, S., Nou, X. 2020. Microbiome convergence following sanitizer treatment and identification of sanitizer resistant species from spinach and lettuce rinse water. *International Journal of Food Microbiology* 318, 108458. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108458>
- Guimaraes, A.J., Gomes, K.X., Cortines, J.R., Peraltac, J.S., Peralt, R.H.S. 2016. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Mirobiological Research* 193, 30-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.001>
- Halloum, I., Carrère-Kremer, S., Blaisea, M., Viljoena, A., Bernuta, A., Le Moigned, L., Vilchèze, C., Guérardel, Y., Lutfall, G., Herrmann, J.L., Jacobs. W.R., Kremer, L. 2016. Deletion of a dehydratase important for intracellular growth and cording renders rough *Mycobacterium abscessus* avirulent. *PNAS* 113 (29), E4228–E4237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605477113>
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science & Technology* 11 (7), 714-719.
- Haselkorn, T.S., Jimenez, D., Bashir, U., Sallinger, E., Queller, D.C., Strassmann, J.E., DiSalvo, S., 2021. Novel *Chlamydiae* and *Amoebophilus* endosymbionts are prevalent in wild isolates of the model social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Environmental Microbiology Reports* 13, 708–719. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12985>
- Hassan, K.A., Fagerlund, A., Elbourne, L.D.H., Voros, A., Kroeger, J.K., Simm, R., Tourasse, N.J., Finke, S., Henderson, P.J.F., Okstad, O.A., Paulsen, I.T., Kolsto, A.B. 2017. The putative drug efflux systems of the *Bacillus cereus* group. *PLoS ONE* 12 (5), e0176188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176188>
- Hassan, A., Rampat, R., Vásquez-Pérez, A. 2021. Severe Keratitis and Corneal Perforation by *Paenibacillus glucanolyticus*. *Cornea* 40 (8), 1062-1064. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002584>
- Hauptka, C., Brito, L.F., Busche, T., Wibberg, D., Wendisch, V.F. 2021. Genomic and Transcriptomic Investigation of the Physiological Response of the Methylophilic *Bacillus methanolicus* to 5-Aminovalerate. *Frontiers in Microbiology* 12, 664598. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664598>
- He, Z., Wang, L., Ge, Y., Zhang, S., Tian, Y., Yang, X., Shu, L. 2021. Both viable and inactivated amoeba spores protect their intracellular bacteria from drinking water disinfection. *Journal of Hazardous Materials* 47, 126006. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126006>
- He, Z., Fan, X., Jin, W., Gao, S., Yan, B., Chen, C., Ding, W., Yin, S., Zhou, X., Liu, X., Li, X., Wang, Q. 2023. Chlorine-resistant bacteria in drinking water: Generation, identification and inactivation using ozone-based technologies. *Journal of Water Process Engineering* 53, 103772. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103772>
- Heaselgrave, W., Patel, N., Kilvington, S., Kehoe, S.C., McGuigan, K.G. 2006. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water – a laboratory study using simulated sunlight. *Letters in Applied Microbiology* 43, 125–130. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01940.x>
- Heaselgrave, W. y Kilvington, S., 2011. The efficacy of simulated solar disinfection (SODIS) against *Ascaris*, *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Entamoeba* and *Cryptosporidium*. *Acta Tropica* 119, 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.004>

He-Ig

- Héchar, Y., Ferraz, S., Bruneteau, E., Steinert, M., Berjeaud, J.M. 2005. Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *FEMS Microbiology Letters* 252 (1), 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.046>
- Heir, E., Moen, B., Asli, A.W., Sunde, M., Langsrud, S. 2021. Antibiotic Resistance and Phylogeny of *Pseudomonas* spp. Isolated over Three Decades from Chicken Meat in the Norwegian Food Chain. *Microorganisms* 9, 207. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020207>
- Henriot, C.P., Martak, D., Genet, S., Bornette, G., Hocquet, D. 2022. Origin, fluxes, and reservoirs of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* in aquatic ecosystems of a French floodplain. *Science of the Total Environment* 834, 155353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155353>
- Herrero-Fresno, A., Zachariasen, C., Hansen, M.H., Nielsen, A., Hendriksen, R.S., Nielsen, S.S., Olsen, J.E. 2016. Apramycin treatment affects selection and spread of a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain able to colonize the human gut in the intestinal microbiota of pigs. *Veterinary Research* 47, 12. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0291-z>
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* 40, 3-22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030>
- Hiti, K., Walochnik, J., Faschinger, C., Haller-Schober, E.M., Aspöck, H. 2005. One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: How effective are they? *Eye* 19, 1301-1305. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701752>
- Hodgson, E. 2010. Introduction to Biotransformation (Metabolism). Chapter 36. En: R. Krieger. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (3rd edition), 865-875. ISBN 9780123743671.
- Hoffman, T.L. Counting cells. En: J.E. Celis. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 3ª Edición. Londres (Reino Unido): Academic Press, 2006, 21-24. ISBN 978-0-12-164730-8. <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50004-6>
- Holt, R.J. y Stewart, G.T. 1964. Production of Amidase and β -Lactamase by Bacteria. *Journal of general Microbiology* 36, 203-213
- Hu, X., B. M. Hansen, J. Eilenberg, N. B. Hendriksen, L. Smidt, Z. Yuan, and G. B. Jensen. 2004. Conjugative transfer, stability, and expression of a plasmid encoding a *cry1Ac* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiology Letters* 231, 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00925-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00925-X)
- Hu, J., Li, Z., Li, L., Sun, Y., Shi, L., Li, W., Zhang, J., Wu, Y., Xu, H., Wang, M. 2023. Detection of multidrug resistant pathogenic bacteria and novel complex class 1 integrons in campus atmospheric particulate matters. *Science of the Total Environment* 856, 158976. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158976>
- Hussein, A.H., Hussein, N.H., Taha, B.M., Rasool, K.H., Al-Kadmy, I.M.S. 2020. Distribution of *Pantoea agglomerans* isolates and molecular detection of *bla*_{PER-1} ESBL gene: A statistical study. *Microbial pathogenesis* 147, 104374. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104374>
- Ignasiak, K. y Maxwell, A. 2017. Antibiotic-resistant bacteria in the guts of insects feeding on plants: prospects for discovering plant-derived antibiotics. *BMC Microbiology* 17, 223. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1133-0>

Im-Ji

Impress. 2020. *Actualización del análisis de presiones, impactos y riesgos en aguas superficiales de la cuenca del Ebro. Tomo 2 – Análisis de presiones, impactos y riesgos*. Zaragoza (España): Área de Calidad de Aguas, Confederación Hidrográfica del Ebro. Disponible en: <http://www.chebro.es>

Ince, D. y Hooper, D.C. 2003. Quinolone Resistance Due to Reduced Target Enzyme Expression. *Journal of Bacteriology* 185 (23), 6883-6892. <https://doi.org/10.1128/JB.185.23.6883-6892.2003>

International Organization for Standardization (ISO). 1990. *Water quality – Determination of free chlorine and total chlorine. Part 3: Iodometric titration method for the determination of total chlorine (7393-3)*. <https://www.iso.org>

Interpro. 2024. *Classification of protein families*. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>

Irajie, C., Mohkam, M., Nezafat, N., Hosseinzadeh, S., Aminlari, M., Ghasemi, Y. 2016. *In Silico Analysis of Glutaminase from Different Species of Escherichia and Bacillus*. *Iranian Journal of Medical Sciences* 41 (5), 406–414.

Jagadeesan, Y., Meenakshisundaram, S., Pichaimuthu, S., Balaiah, A. 2024. A scientific version of understanding “Why did the chickens cross the road”? – A guided journey through *Bacillus* spp. towards sustainable agriculture, circular economy and biofortification. *Environmental Research* 244, 117907. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117907>

Jan, S., Brunet, N., Techer, C., Le Maréchal, C., Koné, A.Z., Grosset, N., Cochet, M.F., Gillard, A., Gautier, M., Puterflam, J., Baron, F. 2011. Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected on farm and in egg product industry. *Food Microbiology* 28, 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.029>

Javanmard, E., Niyayati, M., Lorenzo-Morales, J., Lasjerdi, Z., Behniafar, H., Mirjalali, H. 2017. Molecular identification of waterborne free-living amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Vermamoeba*) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran. *Experimental Parasitology* 183, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.016>

Jensen, V.F., Jakobsen, L., Emborg, H.D., Seyfarth, A.M., Hammerum, A.M. 2006. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 101–107. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl201>

Jeong, M.H., Lee, Y.S., Cho, J.Y., Ahn, Y.S., Moon, J.H., Hyun, H.N., Cha, G.S., Kim, K.Y. 2017. Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial Pathogenesis* 110, 645-653. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.027>

Jia, S., Shi, P., Hu, Q., Li, B., Zhang, T., Zhang, X. 2015. Bacterial community shift drives antibiotic resistance promotion during drinking water chlorination. *Environmental Science Technology* 49, 12271–12279. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03521>

Jia, S., Zhang, X.X., Miao, Y., Zhao, Y., Ye, L., Li, B., Zhang, T. 2017. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water. *Water Research* 124, 259-268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.061>

Ji-Ki

- Jiang, C., Sun, X., Wang, Z., Zhang, Y. 2015. *Acanthamoeba* Keratitis: Clinical Characteristics and Management. *The Ocular Surface* 13 (2), 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2005.10.041>
- Jones, R.N., Li, T.Q., Kohut, B., Biedenbach, D.J., Bell, J., Turnidge, J.D. 2006. Contemporary antimicrobial activity of triple antibiotic ointment: a multiphased study of recent clinical isolates in the United States and Australia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54 (1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.08.009>
- Journal Club of Biotechnology (@Jourbiotech). 2022. “La siembra por estría nos permite obtener colonias separadas. Transfiriendo una sola colonia a un medio de cultivo nuevo, se permite el desarrollo de un cultivo puro bacteriano. #biotech #scicomm #bacteria”. 12 enero 2022, 2:34 p.m., [Tuit]. Disponible en: <https://twitter.com/Jourbiotech/status/1481258285789503490>
- June, C.M., Vallier, B.C., Bonomo, R.A., Leonard, D.A., Powers, R.A. 2014. Structural Origins of Oxacillinase Specificity in Class D β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1), 331–341. <https://doi.org/10.1128/AAC.01483-13>
- Kandasamy, G.D. y Kathirvel, P. 2023. Insights into bacterial endophytic diversity and isolation with a focus on their potential applications – A review. *Microbiological Research* 266, 127156. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127256>
- Kawai, Y., Marles-Wright, J., Cleverley, R.M., Emmins, R., Ishikawa, S., Kuwano, M., Heinz, N., Bui, N.K., Hoyland, C.N., Ogasawara, N., Lewis, R.J., Vollmer, W., Daniel, R.A., Errington, J. 2011. A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *The EMBO Journal* 30, 4931–4941. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.358>
- Khajouei, G., Finkle, H.O., Lin, L.S. 2022. UV/chlorine advanced oxidation processes for degradation of contaminants in water and wastewater: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10, 107508. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107508>
- Khan, N.A. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis* 34, 277–285. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00061-5](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00061-5)
- Khoo, L.W., Srinivasana, S.S., Henriquez, F.L., Bal, A.M. 2020. A Rare Case of Mixed Infectious Keratitis Caused by *Pseudomonas koreensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Case Reports in Ophthalmology* 11, 600–605. <https://doi.org/10.1159/000510571>
- Khunkitt, W., Lloyd, J.R., Furr, A.D., Russell, J. 1998. *Acanthamoeba castellanii*: Growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *Journal of Infection* 36, 43–48. [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(98\)93054-7](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(98)93054-7)
- Kilvington, S. y Price, J. 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 519–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02904.x>
- Kim, D.W., Feng, J., Chen, H., Kweon, O., Gao, Y., Yu, L.R., Burrowes, V.J., Sutherland, J.B. 2013. Identification of the Enzyme Responsible for N-Acetylation of Norfloxacin by *Microbacterium* sp. Strain 4N2-2. *Applied Environmental Microbiology* 79 (1), 314–321. <https://doi.org/10.1128/AEM.02347-12>

Ki-Kw

- Kim, D.W., Thawng, C.N., Lee, K., Wellington, E.M.H., Cha, C.J. 2019. A novel sulfonamide resistance mechanism by two-component flavin-dependent monooxygenase system in sulfonamide-degrading actinobacteria. *Environment International* 127, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.046>
- Kimouli, M., Vrioni, G., Papadopoulou, M., Koumaki, V., Petropoulou, D., Gounaris, A., Friedrich, A.W., Tsakris, A. 2012. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *Journal of Medical Microbiology* 61 (4), 596–599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033175-0>
- King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E., Porter, K.G. 1988. Survival of Coliforms and Bacterial Pathogens within Protozoa during Chlorination. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (12), 3023–3033. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3023-3033.1988>
- Kochansky, J., Knox, D.A., Feldlaufer, M., Pettis, J.S. 2001. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 32 (3), 215–222. <https://doi.org/10.1051/apido:2001123>
- Kolar, S.S.N., Manarang, J.C., Burns, A.R., Miller, W.L., McDermott, A.M., Bergmanson, J.P.G. 2015. Contact lens care solution killing efficacy against *Acanthamoeba castellanii* by in vitro testing and live-imaging. *Contact Lens & Anterior Eye* 38, 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2015.06.006>
- Kovacs, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., Mhrialigeti, K. 1999. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 167–173. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-167>
- Kuiper, M.W., Valster, R.M., Wullings, B.A., Boonstra, H., Smidt, H., Kooij, D. 2006. Quantitative Detection of the Free-Living Amoeba *Hartmannella vermiformis* in Surface Water by Using Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), 5750–5756. <https://doi.org/10.1128/AEM.00085-06>
- Kumar, K., Gupta, S.C., Chander, Y., Singh, A.K. 2005. Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. *Advances in Agronomy* 87, 1–54. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)87001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)87001-4)
- Kumari, K., Sharma, P., Tyagi, K. Lal, R. 2011. *Pseudoxanthomonas indica* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dumpsite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 2107–2111. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017624-0>
- Kumawat, M., Nabi, B., Daswani, M., Viqar, I., Pal, N., Sharma, P., Tiwari, S., Sarma, D.K., Shubham, S., Kumar, M. 2023. Role of bacterial efflux pump proteins in antibiotic resistance across microbial species. *Microbial Pathogenesis* 181, 106182. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106182>
- Kuo, S.F. y Lee, C.H. 2018. An oil refinery worker at Kaohsiung, with *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis* bloodstream infection presenting as chronic pericarditis and masquerading as tuberculosis pericarditis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 51, 575–577. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.12.003>
- Kwon, S.W. y Kim, J.S. En Park, C. Yoon, S.H., Park, D.H., Lim, C.K., Go, S.J. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 21–27. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02326-0>

La-Li

- Laffineur, K., Avesani, V., Cornu, G., Charlier, J., Janssens, M., Wauters, G., Delmée, M. 2003. Bacteremia Due to a Novel Microbacterium Species in a Patient with Leukemia and Description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (5), 2242–2246. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2242-2246.2003>
- Lanao, M., Ormad, M.P., Goñi, P., Miguel, N., Mosteo, R., Ovelleiro, J.L. 2010. Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂. *Solar Energy* 84, 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2010.01.023>
- Lanao, M. 2012. *Investigación de la inactivación de Clostridium perfringens y Enterococcus sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación*. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. ISSN 2254-7606.
- Lanniello, N.M., Andrade, D.C., Ivancic, S., Eckardt, P.A., Lemos Ramirez, J.C. 2019. Native valve infective endocarditis due to *Micrococcus luteus* in a non-Hodgkin's lymphoma patient. *IDCases* 18, e00657. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00657>
- Lass, A., Guerrero, M., Li, X., Karanis, G., Ma, L., Karanis, P. 2017. Detection of *Acanthamoeba* spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. *Science of the Total Environment* 584–585, 489–494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.046>
- Lata, P., Govindarajan, S.S., Qi, F., Li, J.L., Sahood, M.K. 2017. Deep Sequencing-Identified Kanamycin-Resistant *Paenibacillus* sp. Strain KS1 Isolated from Epiphyte *Tillandsia usneoides* (Spanish Moss) in Central Florida, USA. *Genome Announcements* 5 (5), e01523-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01523-16>
- Lau, M.M.L., Kho, C.J.Y., Chung, H.H., Zulkharnain, A. 2024. Isolation, identification and characterisation of *Pseudomonas koreensis* CM-01 isolated from diseased Malaysian mahseer (*Tor tambroides*). *Fish and Shellfish immunology* 148, 109518. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109518>
- Lean, S.S., Shang, A.Z., Booth, T., Lacey, E., Chooi, Y.H. 2021. The genome of *Micrococcus luteus* MST-118984C isolated from Australian soil harbours a bacteriocin biosynthetic gene cluster and biocide/multidrug efflux genes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 58 S1, 21002727. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106421.1>
- Lee, H.B. y Park, J.S. 2023. Characterizations of four freshwater amoebae including opportunistic pathogens newly recorded in the Republic of Korea. *Journal of Ecology and Environment* 47, 11. <https://doi.org/10.5141/jee.23.030>
- Lei, L., Chen, N., Chen, Z., Zhao, Y., Lin, H., Li, X., Hu, W., Zhang, H., Shi, J., Luo, L. 2024. Dissemination of antibiotic resistance genes from aboveground sources to groundwater in livestock farms. *Water Research* 256, 121584. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121584>
- Li, Y., Yang, L., Fu, J., Yan, M., Chen, D., Zhang, L. 2017. Microbial pathogenicity and virulence mediated by integrons on Gram-positive microorganisms. *Microbial Pathogenesis* 111, 481-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.035>
- Lim, K.T., Yasin, R., Yeo, C.C., Puthuchear, S., Thong, K.L. 2009. Characterization of Multidrug Resistant ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolates from Hospitals in Malaysia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1, 165637. <https://doi.org/10.1155/2009/165637>

Li-Ma

Liu, R., Yu, Z., Guo, H., Liu, M., Zhang, H., Yang, M. 2012. Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. *Science of the Total Environment* 435–436, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.022>

Löffler, P., Escher, B.I., Baduel, C., Virta, M.P., Lai, F.Y. 2023. Antimicrobial Transformation Products in the Aquatic Environment: Global Occurrence, Ecotoxicological Risks, and Potential of Antibiotic Resistance. *Environmental Science & Technology* 57 (26), 9474–9494. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c09854>

Lonnen, J., Kilvington, S., Kehoe, S.C., Al-Touatic, F., McGuiganc, K.G. 2005. Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Research* 39, 877–883. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.023>

López, A. 2017. *I Cursillo de Filogenia y Filogeografía: Parte 1. Reconstrucción de Filogenias*. Murcia (España): Universidad de Murcia. Disponible en: <https://webs.um.es/alopez/miwiki/doku.php?id=cursofilogenia>

López, A. 2018. *Evaluación de tecnologías en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental*. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. ISSN 2254-7606.

Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martínez, E., Valladares, B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research* 95 (4), 273–277. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1301-2>

Loret, J.F. y Greub, G. 2010. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.03.004>

Lozano-León, A., Iglesias-Canle, J., Seijo-Rios, S., Dominguez-Muñoz, J.E. 2008. First Reported Isolation of Multiresistant *Staphylococcus warneri* in Gastrointestinal Disease. *Clinical Microbiology Newsletter* 30, 19, 148–149. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.09.002>

Lu, N., Sun, S., Chu, F., Wang, M., Zhao, Q., Shi, J., Jia, R, 2020. Identification and inactivation of gordonia, a new chlorine-resistant bacterium isolated from a drinking water distribution system. *Journal of Water & Health* 18 (6), 995–1008. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.143>

Lugo, I.A., Ortiz, I.S., Padilla, I.W., Sanches, D.S., Valdivia, R.M., Betartez, L.G. 2019. *Biopesticide and biofertiliser composition*. Cuba: Patent 2019-0071. European Patent Office. Disponible en: <https://www.data.epo.org>

Lyng, M. y Kovács, A.T. 2023. Frenemies of the soil: *Bacillus* and *Pseudomonas* interspecies interactions. *Trends in Microbiology* 31 (8), 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.02.003>

Ma, L., Zhang, X.X., Zhao, F., Wu, B., Cheng, S., Yang, L. 2013. Sewage treatment plant serves as a hot-spot reservoir of integrons and gene cassettes. *Journal of Environmental Biology* 34, 391–399.

Ma, P., Prestigiacomo, C., Proietto, F., Galia, A., Scialdone, O. 2021. Electrochemical Treatment of Wastewater by ElectroFenton, Photo-ElectroFenton, Pressurized-ElectroFenton and Pressurized Photo ElectroFenton: A First Comparison of these Innovative Routes. *ChemElectroChem* 8 (16), 3135–3142. <https://doi.org/10.1002/celec.202100736>

Ma-Ma

- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Magnet, A., Fenoy, S., Galván, A.L., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernández Vadillo, C., del Águila, C. 2013. A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Research* 47, 6966–6972. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.065>
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Blanco, J., Gernjak, W. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today* 147, 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>
- Mamane, H., Shemer, H., Linden, K.G. 2007. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation. *Hazardous Materials* 146, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.050>
- Maniakova, G., Salmerón, I., Nahim-Granados, S., Malato, S., Oller, I., Rizzo, L., Polo-López, M.I. 2021. Sunlight advanced oxidation processes vs ozonation for wastewater disinfection and safe reclamation. *Science of the Total Environment* 787, 147531. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147531>
- Manson, J.M., Smith, J.M., Cook, G.M. 2004. Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use. *Applied Environmental Microbiology* 70, 5764–5768. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5764-5768.2004>
- Marathe, N.P., Pal, C., Gaikwad, S.S., Jonsson, V., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2017. Untreated urban waste contaminates Indian River sediments with resistance genes to last resort antibiotics. *Water Research* 124, 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.060>
- Marchand, A., Verdon, J., Lacombe, C., Crapart, S., Héchard, Y., Berjeaud, J.M. 2011. Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides* 32, 845–851. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.025>
- March-Roselló, G.A. 2017. Métodos rápidos para la detección de la resistencia a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 35 (3), 182–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>
- Marín, I., Goñi, P., Lasheras, A.M., Ormad, M.P. 2014. 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://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.027>
- Markovska, R., Stoeva, T., Dimitrova, D., Boyanova, L., Stankova, P., Mihova, K., Mitov, I. 2019. Quinolone resistance mechanisms among thirdgeneration cephalosporin resistant isolates of *Enterobacter* spp. in a Bulgarian university hospital. *Infection and Drug Resistance* 12, 1445–1455. <https://doi.org/10.2147/IDR.S204199>
- Marti, E., Variatza, E., Balcazar, J.L. 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology* 22 (1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>

Ma-Mi

Martín, A., Corbera, J., Cano, O., Preece, C., Penuelas, J., Sabater, F., Fernández-Martínez, M. 2024. The influence of nitrate pollution on elemental and isotopic composition of aquatic and semi-aquatic bryophytes. *Aquatic Botany* 190, 103710. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2023.103710>

Martínez, A. y González, A. 2004. Aplicaciones de la Bioinformática en la Elaboración de Filogenias Moleculares. En: N. Pedreira y J.R. Rabuñal. *El Reto de la Bioinformática*. Santiago de Compostela (España): Fundación Alfredo Brañas, 53–81. ISBN: 84-88051-49-2. Disponible en: <https://www.udc.es/grupos/gibe/uploads/gibe/andres%20ana/filogenias.pdf>.

Martínez, J.L. 2003. Recent advances on antibiotic resistance genes. En: M. Fingerman. *Recent Advances in Marine Biotechnology. Molecular Genetics of Marine Organisms*. Volumen 10 (pp. 13–32). Boca Raton, Florida (Estados Unidos): CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482294361>

Martínez-García, A., Nahim-Granados, S., Berruti, I., Oller, I., Polo-Lopez, M.I. 2023. Assessment of solar water disinfection enhancement with H₂O₂ and dissolved oxygen on inactivating different waterborne pathogens. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 11 (6), 111145. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111145>

Marutescu, L.G., Jaga, M., Postolache, C., Barbuceanu, F., Milita, N.M., Romascu, L.M., Schmitt, H., Husman, A.M.r., Sefeedpari, P., Glaeser, S., Kämpfer, P., Boerlin, P., Topp, E., Pircalabioru, G.G., Chifiriuc, M.C., Popa, M. 2022. Insights into the impact of manure on the environmental antibiotic residues and resistance pool. *Frontiers in Microbiology* 13, 965132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.965132>

Mathews, S.L., Smithson, C.E., Grunden, A.M. 2016. Purification and characterization of a recombinant laccase-like multi-copper oxidase from *Paenibacillus glucanolyticus* SLM1. *Journal of Applied Microbiology* 121 (5), 1335–1345. <https://doi.org/10.1111/jam.13241>

Maya, C., Beltrán, N., Jiménez, B., Bonilla, P. 2003. Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoebae inactivation. *Water Science and Technology: Water Supply* 3 (4), 285–291. <https://doi.org/10.2166/ws.2003.0074>

McGaha, M. y Champney, W.S. 2007. Hygromycin B Inhibition of Protein Synthesis and Ribosome Biogenesis in *Escherichia coli* Susan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (2), 591–596. <https://doi.org/10.1128/AAC.01116-06>

Michael, S.G., Michael-Kordatou, I., Nahim-Granados, S., Polo-López, M.I., Rochad, J, Martínez-Piernas, A.B., Fernández-Ibáñez, P., Agüera, A., Manaia, C.M., Fatta-Kassinos, D. 2020. Investigating the impact of UV-C/H₂O₂ and sunlight/H₂O₂ on the removal of antibiotics, antibiotic resistance determinants and toxicity present in urban wastewater. *Chemical Engineering Journal* 388, 124383. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124383>

Milanez, G., Masangkay, F., Somsak, V., Kotepui, M., Tangpong, J., Karanis, P. 2019. Occurrence and the first report of *Naegleria australiensis* presence in a major lake in the Philippines. *Journal of Water Health* 17 (4), 647–653. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.034>

Miller, S.A., Ferreira, J.P., LeJeune, J.T. 2022. Antimicrobial Use and Resistance in Plant Agriculture: A One Health Perspective. *Agriculture* 12, 289. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020289>

Ministerio de Sanidad. 2023. *Censo de aguas de baño en España para la temporada 2023*. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es>

Mi-Mo

Ministerio de Sanidad y Consumo. 1995. Resistencia Microbiana: ¡Qué hacer? Informe del panel de expertos. *Revista Española de Salud Pública* 69, 445–461. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL69/69_6_445.pdf

Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (s.f.). *Ciclo integral del agua urbana. Sistemas de gestión y atención al ciudadano, captación y potabilización, distribución, alcantarillado y drenaje urbano, depuración y gestión de lodos*. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/sistema-espaniol-gestion-agua/eficacia_en_el_servicio.html

Mitchell, S.W., Moran, R.A., Elbourne, L.D.H., Chapman, B., Bull, M., Muscatello, G., Coleman, N.V. 2023. Impacts of Domestication and Veterinary Treatment on Mobile Genetic Elements and Resistance Genes in Equine Fecal Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 89 (3). <https://doi.org/10.1128/aem.01590-22>

Mohammed, A. N. 2016. Field study on evaluation of the efficacy and usability of two disinfectants for drinking water treatment at small cattle breeders and dairy cattle farms. *Environmental Monitoring and Assessment* 188, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5147-0>

Mohanta, T. y Goel, S. 2014. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in three different aquatic environments over three seasons. *Environmental Monitoring Assessment* 186, 5089–5100. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3762-1>

Moles, S. 2021. *Eliminación de antibióticos de aguas contaminadas mediante fotocátalisis y adsorción*. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. ISSN 2254-7606.

Moliner, C., Fournier, P., Raoult, D. 2010. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 281–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00209.x>

Moreira, N.F.F., Narciso-da-Rocha, C., Polo-Lopez, M.I., Pastrana-Martínez, L.M., Faria, J.L., Manaia, C.M., Fernández-Ibáñez, P., Nunes, O.C., Silva, A.M.T. 2018. Solar treatment (H₂O₂, TiO₂-P25 and GO-TiO₂ photocatalysis, photo-Fenton) of organic micropollutants, human pathogen indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. *Water Research* 135, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.064>

Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. 2017. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environmental Microbiology* 19 (10), 4103–4112. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13856>

Moreno-Mesonero, L., Ferrús, M.A., Moreno, Y. 2020a. Determination of the bacterial microbiome of free-living amoebae isolated from wastewater by 16S rRNA amplicon based sequencing. *Environmental Research* 190, 109987 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109987>

Mo-Na

- Moreno-Mesonero, L., Hortelano, I., Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2020b. Evidence of viable *Helicobacter pylori* and other bacteria of public health interest associated with free-living amoebae in lettuce samples by next generation sequencing and other molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 318, 108477. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108477>
- Morris, S.D., Kumar, V.A., Biswas, R., Mohan, C.G. 2023. Identification of a *Staphylococcus aureus* amidase catalytic domain inhibitor to prevent biofilm formation by sequential virtual screening, molecular dynamics simulation and biological evaluation. *Interacional Journal of Biological Macromolecules* 254, Part 2, 127842. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127842>
- Moses, I.B., Santos, I.N.M.S., Cardoso, A., Ribeiro, S., Santos, F.F., Cayo, R., Gales, A.C. 2024. Co-resistance to methicillin and clindamycin among coagulase-negative *Staphylococci* isolates recovered from pet food in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 418, 110726. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110726>
- Mosteo, R. 2011. Impacto de vertidos procedentes de la industria agroalimentaria en una EDAR urbana: Industria de elaboracion del vino. En: M.P. Ormad y B. Calvo. *Gestión y tratamiento de aguas residuales*. España: Stylo Digital. ISBN 978-84-938668-0-8.
- Mosteo, R., Ormad, M.P., Goñi, P., Rodríguez-Chueca, J., García, A., Clavel, A. 2013. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): Water reuse possibilities. *Water Science and Technology* 68, 575–583. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.201>
- Muchesa, P., Leifels, M., Jurzik, L., Barnard, T.G. Bartie, C. 2018. Detection of amoeba-associated *Legionella pneumophila* in hospital water networks of Johannesburg. *Southern African Journal of Infectious Diseases* 33 (3), 72–75. <https://doi.org/10.4102/sajid.v33i3.8>
- Muchesa, P., Bartie, C., Barnard, T.G. 2019. Free-Living Amoebae and Associated Drug-Resistant Bacteria in Surface Waters: A Public Health Concern? En: H. Mehlhorn, S. Klimpel. *Parasite and Disease Spread by Major Rivers on Earth. Parasitology Research Monographs*. Vol 12. Nueva York (Estados Unidos): Springer, Cham. ISBN 978-3-030-29060-3. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29061-0_9
- Mukuna, W., Aniume, T., Pokharell, B., Khwatenge, C., Basnet, A., Kilonzo-Nthenge, A. 2023. Antimicrobial Susceptibility Profile of Pathogenic and Commensal Bacteria Recovered from Cattle and Goat Farms. *Antibiotics* 12 (2), 420. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020420>
- Naciones Unidas. 2015. *Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development*. San Francisco, California (Estados Unidos). Disponible en: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld/publication>
- Naciones Unidas. 2018. *Water quality and wastewater*. Ginebra (Suiza): UN Water. Disponible en: https://www.unwater.org/sites/default/files/app/uploads/2018/10/WaterFacts_water_and_wastewater_sep2018.pdf
- Navarro, A., Sanseverino, I., Cappelli, F., Lahm, A., Niegowska, M., Fabbri, M., Paracchini, V., Petrillo, M., Skejo, H., Valsecchi, S., Pedraccini, R., Guglielmetti, S., Frattini, S., Villani, G., Lettieri, T. 2023. Study of antibiotic resistance in freshwater ecosystems with low anthropogenic impact. *Science of the Total Environment* 857, 159378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159378>

Nd-Ok

Ndagi, U., Falaki, A.A., Abdullahi, M., Lawald, M., Soliman, M.E. 2020. Antibiotic resistance: bioinformatics-based understanding as a functional strategy for drug design. *Royal Society of Chemistry Advances* 10, 18451. <https://doi.org/10.1039/d0ra01484b>

Nei, M. y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Nueva York (Estados Unidos): Oxford University Press, Inc. ISBN 0-19-513584-9.

Nepal, K.K., Yoo, J.C., Sohng, J.K. 2010. Functional characterization of KanP, a methyltransferase from the kanamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces kanamyceticus*. *Microbiological Research* 165, 557-564. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.002>

Network for Evaluation of One Health. 2018. *Integrated approaches to health A handbook for the evaluation of One Health*. Wageningen (Países Bajos): Wageningen Academic Publishers. ISBN: 978-90-8686-324-2.

Nikolskaya, A.N. y Galperin, M.Y. 2002. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Research* 30 (11), 2453–2459. <https://doi.org/10.1093/nar/30.11.2453>

Nisar, M.A., Ross, K.E., Brown, M.H., Bentham, R., Hinds, J., Whiley, H. 2022. Molecular screening and characterization of *Legionella pneumophila* associated free-living amoebae in domestic and hospital water systems. *Water Research* 226, 119238. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119238>

Nishimura, Y., Adachi, H., Kyo, M., Murakami, S., Hattoria, S., Ajito, K. 2005. A proof of the specificity of kanamycin-ribosomal RNA interaction with designed synthetic analogs and the antibacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 2159–2162. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.02.043>

Niyyati, M., Lasjerdi, Z., Nazar, M., Haghighi, A., Mojarad, E.N. 2012. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *Journal of Water & Health* 10 (1), 140–146. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.068>

Nogueira, R.F.P., Oliveira, M.C., Paterlini, W.C. 2005. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. *Talanta* 66 (1), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.10.001>

O'Neill, J. 2014. *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance Chaired*. Reino Unido: Review on Antimicrobial Resistance. Disponible en: <https://amr-review.org/>

Ogawara, H. 2019. Comparison of Antibiotic Resistance Mechanisms in Antibiotic-Producing and Pathogenic Bacteria. *Molecules* 24, 3430. <https://doi.org/10.3390/molecules24193430>

Ogunlana, L., Kaur, D., Shaw, L.P., Jangir, P., Walsh, T., Uphoff, S., MacLean, R.C. 2023. Regulatory fine-tuning of *mcr-1* increases bacterial fitness and stabilises antibiotic resistance in agricultural settings. *The ISME Journal* 17, 2058–2069. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01509-7>

Okkotsu, Y., Little, A.S., Schurr, M.J. 2014. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (82). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00082>

OI-Ou

Oliveira, R.P., Aragao, B.B., Melo, R.P.B., Silva, D.M.S., Carvalho, R.G., Juliano, M.A., Farias, M.P.O., Lira, N.S.C., Mota, R.A. 2022. Bovine mastitis in northeastern Brazil: Occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 85, 101802. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101802>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2001. *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos*. Ginebra (Suiza): OMS. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/67197>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. *Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe*. Copenhagen (Dinamarca): Oficina Regional de la OMS para Europa. ISBN 978-92-890-1421-2. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/326398>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2016. *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. Génova (Suiza): OMS. ISBN 978-92-4-350976-1. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. *Antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana. 6.ª revisión. Clasificación de los antimicrobianos de importancia médica para gestionar el riesgo de resistencia a los antimicrobianos debido a su uso no humano*. Ginebra (Suiza): OMS. ISBN 978-92-4-351552-6.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2022. *Guidelines for Drinking-Water Quality, Fourth ed.: Incorporating the First and Second Addenda*. Génova (Suiza): OMS. ISBN 978-92-4-004506-4. Disponible: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2023. *Agua para consumo humano*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>

Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). 2022. *Annual Report on Antimicrobial Agents intended for Use in Animals. 7th Report*. París (Francia): OMSA. Disponible en: <https://www.woah.org/app/uploads/2023/05/a-seventh-annual-report-amu-final.pdf>

Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). 2023. *Uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento: La OMSA insta a las autoridades veterinarias y a la industria de la producción animal a cumplir sus compromisos*. Disponible en: <https://www.woah.org/app/uploads/2024/01/es-omsa-declaraciondeposicion-agp.pdf>

Ortillés, A., Goñi, P., Rubio, E., Sierra, M., Gámez, E., Fernandez, M.T., Benito, M., Cristóbal, M.B., Calvo, B. 2017. A rabbit model of *Acanthamoeba* keratitis: use of infected soft contact lenses after corneal epithelium debridement with a diamond burr. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58 (2), 1218–1227. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21100>

Ospina-Arias, O., García-Cobas, G., Gordillo-Rivera, J., Tovar-Hernández, K. 2016. Evaluación de la turbiedad y la conductividad ocurrida en temporada seca y de lluvia en el río Combeima (Ibagué, Colombia). *Ingeniería Solidaria* 12 (19), 19–36, <http://dx.doi.org/10.16925/in.v12i19.1191>

Ounissi, H., Derlot, E., Carlier, C., Courvalin, P. 1990. Gene Homogeneity for Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Gram-Positive Cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34 (11), 2164–2168. <https://doi.org/10.1128/aac.34.11.2164>

Oy-Pe

- Oyewale, A.T., Odetoyin, B.W., Oluduro, A.O., Adeniyi, I.F. 2024. Occurrence of coliforms and biofilm-forming bacteria in raw, treated, and distributed water from two waterwork systems in Osun State, Southwestern Nigeria. *Journal Water & Health* 22 (4), 673–688. <https://doi.org/10.2166/wh.2024.302>
- Ozaktas, T., Taskin, B., Gozen, A.G. 2012. High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture freshwater environment. *Water Research* 46, 6382–6390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.010>
- Page, F.C. 1988. *A new key to freshwater and soil Gymnamoebae, with instructions for culture*. Londres, Reino Unido: Ferry House, Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(89\)80039-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(89)80039-9)
- Pagnier, I., Raoult, D., La Scola, B. 2008. Isolation and identification of amoebae resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environmental Microbiology* 10 (5), 1135–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01530.x>
- Pagnier, I., Valles, C., Raoult, D., La Scola, B. 2015. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microbial pathogenesis* 80, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.02.006>
- Paniagua-Crespo, E., Marti-Mallen, M., Penas-Ares, M., Arias-Fernandez, M. C., Combarro-Combarro, M. P. 1990. Isolation of amoebae of the genera *Naegleria* and *Acanthamoeba* from public fountains in Galicia (NW Spain). *Water, Air & Soil Pollution* 53 (1–2), 103–111. <https://doi.org/10.1007/BF00154994>
- Papich, M.G. 2016. Oxacillin Sodium, En: Editor(s): M.G. Papich. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large Animal*. 4ª Edición (pp. 585–586). Filadelfia (Estados Unidos): W.B. Saunders. ISBN 9780323244855. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00425-3>.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 31, e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Pasteran, F., Cedano, J., Baez, M., Albornoz, E., Rapoport, M., Osteria, J., Montaña, S., Le, C., Ra, G., Bonomo, R.A., Tolmasky, M.E., Adams, M., Corso, A., Ramirez, M.S. 2021. A New Twist: The Combination of Sulbactam/Avibactam Enhances Sulbactam Activity against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) Isolates. *Antibiotics* 10, 577. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050577>
- Pawlowski, A.C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H.A, McArthur, A.G., Wrighta, G.D. 2016. A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nature Communications* 7, 13803. <https://doi.org/10.1038/ncomms13803>
- Pednekar, P.B., Jain, R., Thakur, N.L. Mahajan, G.B. 2010. Isolation of Multi-Drug Resistant *Paenibacillus* sp. from Fertile Soil: An Imminent Menace of Spreading Resistance. *Journal of Life Sceinces* 4 (5). ISSN 1934-7391.
- Pekala, A., Pazdziora, E., Antychowicz, J., Bernad, A., Glowacka, H., Więceka, B., Niemczuk, W. 2018. *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture* 486, 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.028>

Pe-Po

- Pélandakis, M. y Pernin, P. 2002. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4), 2061–2065. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.2061-2065.2002>
- Penas-Ares, M., Raniagua-Crespo, E., Madriñán-Chore, R., Marti-Mallen, M., Arias-Fernandez, M.C. 1994. Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in N.W. Spain. *Water, Air, Soil Pollution* 78 (1–2), 83–90. <https://doi.org/10.1007/BF00475670>
- Pérez, J.I., Álvarez-Arroyo, R., Arrieta, J., Suescun, J.M., Paunero, S., Gómez, M.A. 2022. Occurrence of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria (ARB) in the Nervión river. *Chemosphere* 288, 132479. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132479>
- Pérez-Etayo, L. 2021. *Vigilancia, prevención, diagnóstico y tratamiento de las resistencias a antibióticos β -lactámicos desde la perspectiva One Health*. Tesis doctoral, Universidad de Navarra, Pamplona. <https://doi.org/10.15581/10171/65393>
- Pichel, N., Vivar, M., Fuentes, M. 2019. The problem of drinking water access: A review of disinfection technologies with an emphasis of disinfection technologies with an emphasis on solar treatment methods. *Chemosphere* 218, 1014–1030. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.205>
- Pierron, A., Zayet, S., Toko, L., Royer, P.Y., Garnier, P., Gendrin, V. 2021. Catheter-related bacteremia with endocarditis caused by *Kocuria rhizophila*. *Infectious Diseases Now* 51, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.09.007>
- Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN). 2023. *Consumos Antibióticos en Veterinaria*. Disponible en: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/lineas-de-accion/vigilancia/mapas-de-consumo/consumos-antibioticos-veterinaria>
- Plattner, M., Gysin, M., Haldimann, K., Becker, K., Hobbie, S.N. 2020. Epidemiologic, Phenotypic, and Structural Characterization of Aminoglycoside-Resistance Gene *aac(3)-IV*. *International Journal of Molecular Science* 21 (17), 6133. <https://doi.org/10.3390/ijms21176133>
- Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert, T. 2000. Molecular Characterization of Integrins in *Acinetobacter baumannii*: Description of a Hybrid Class 2 Integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (10), 2684–2688. <https://doi.org/10.1128/aac.44.10.2684-2688.2000>
- Plutzer, J. y Karanis, P. 2016. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Research* 101, 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.085>
- Polo-López, M.I., García-Fernández, I., Oller, I., Fernández-Ibáñez, P. 2011. Solar disinfection of fungal spores in water aided by low concentrations of hydrogen peroxide. *Photochemical & Photobiological Science* 10, 381–388. <https://doi.org/10.1039/c0pp00174k>
- Polo-López, M.I., Castro-Alfárez, M., Nahim-Granados, S., Malato S., Fernández-Ibáñez, P. 2017. *Legionella jordanis* inactivation in water by solar driven processes: EMA-qPCR versus culture-based analyses for new mechanistic insights. *Catalysis Today* 287, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.10.029>
- Porcellato, D., Kristiansen, H., Finton, M.D., La Rosa, S.L., Duarte, V.S., Skeie, S.B. 2023. Composition and fate of heat-resistant anaerobic spore-formers in the milk powder production line. *International Journal of Food Microbiology* 402, 110281. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110281>

Pu-Re

- Putaporntip, C., Kuamsab, N., Nuprasert, W., Rojrung, R., Pattanawong, U., Tia, T., Yanmanee, S., Jongwutiwes, S. 2021. Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba* bangkokensis sp. nov. *Scientific Reports* 11, 17290. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96690-0>
- Qvarnstrom, Y., da Silva, A.J., Schuster, F.L., Gelman, B.B., Visvesvara, G.S. 2009. Molecular Confirmation of *Sappinia pedata* as a Causative Agent of Amoebic Encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases* 199, 1139–1142. <https://doi.org/10.1086/597473>
- Rajaei, A., Rowe, H.M., Neely, M.N. 2022. The LCP Family Protein, Psr, Is Required for Cell Wall Integrity and Virulence in *Streptococcus agalactiae*. *Microorganisms* 2022, 10, 217. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020217>
- Ramírez, M.S., Piñeiro, S., Argentinian Integron Study Group, Centrón, D. 2010. Novel Insights about Class 2 Integrons from Experimental and Genomic Epidemiology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (2), 699–706. <https://doi.org/10.1128/AAC.01392-08>
- Ramirez, M.S. y Tolmasky, M.E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* 13, 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
- Ramlucken, U., Lalloo, R., Roets, Y., Moonsamy, G., Rensburg, C.J., Thantsh, M.S. 2020. Advantages of *Bacillus*-based probiotics in poultry production. *Livestock Science* 241, 104215. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104215>
- Rangasamy, K., Athiappan, M., Devarajan, N., Parray, J.A., Shameem, N., Aruljothi, K.N., Hashem, A., Alqarawi, A.A., Allah, E.F.A. 2018. Cloning and Expression of the Organophosphate Pesticide-Degrading α - β Hydrolase Gene in Plasmid pMK-07 to Confer Cross-Resistance to Antibiotics. *BioMed Research International* 1535209, 13. <https://doi.org/10.1155/2018/1535209>
- Rayamajhee, B., Willcox, M.D.P., Henriquez, F.L., Petsoglou, C., Subedi, D., Carnt, N. 2022. *Acanthamoeba*, an environmental phagocyte enhancing survival and transmission of human pathogens. *Trends in Parasitology* 38 (11), 975–990. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.08.007>
- Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 54 de 21 de febrero de 2003.
- Real Decreto 1620/2007 de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE 294 de 8 de diciembre de 2007.
- Real Decreto 487/2022 de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis. BOE 148 de 22 de junio de 2022.
- Real Decreto 3/2023 de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. BOE 9 de 11 de enero de 2023.
- Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencia a Antibióticos (VAV). 2005. *Informe Nº 12. C.E.R.S.A. Madrid (España): VAV. ISBN: 978-84-690-5658-5. Disponible en: https://www.visavet.es/data/VAV2005.pdf*
- Reglamento (CE) 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea L268/29 de 18 de octubre de 2003.

Re-Ri

Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018, sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. BOE 4 de 7 de enero de 2019.

Remucal, C.K. y Manley, D. 2016. Emerging investigators series: The efficacy of chlorine photolysis as an advanced oxidation process for drinking water treatment. *Environmental Science & Water Research Technology* 2, 565–579. <https://doi.org/10.1039/C6EW00029K>

Requena, D. y Gil, A. 2020. Citoquímico del líquido cefalorraquídeo: recomendaciones para su análisis, interpretación y reporte de resultados. *Comunidad y Salud* 18 (2). ISBN 1690-3293.

Ripon, R.K., Motahara, U., Ahmed, A., Devnath, N., Mahua, F.A., Hashem, R.B., Ishadi, K.S., Alam, A., Sujon, M.S.H., Sarker, M.S. 2023. Exploring the prevalence of antibiotic resistance patterns and drivers of antibiotics resistance of *Salmonella* in livestock and poultry-derived foods: a systematic review and meta-analysis in Bangladesh from 2000 to 2022. *JAC-Antimicrobial Resistance* 5 (3). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlad059>

Rivera, F., Cerva, L., Martínez, J., Keleti, G., Lares, F., Ramirez, E., Bonilla, P., Graner, S.R., Saha, A.K., Glew, R.H. 1990. *Naegleria lovaniensis* tarasca new subspecies, and the purepecha strain, a morphological variant of *N. lovaniensis*, isolated from natural thermal waters in Mexico. *Journal of Protozoology* 37, 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1990.tb01150.x>

Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sanchez-Melsi, A., Borrego, C.M., Barcel, D., Balcazar, J.L. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research* 69, 234–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>

Rodríguez-Nava, G., Mohamed, A., Yanez-Bello, M.A., Trelles-Garcia, D.P. 2020. Advances in medicine and positive natural selection: Prosthetic valve endocarditis due to biofilm producer *Micrococcus luteus*. *IDCases* 20, e00743. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00743>

Rodríguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20, 225–241. <https://doi.org/10.3109/10408419409114556>

Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F., Wilhelm, M. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Applied Environmental Microbiology* 64, 1822–1824. <https://doi.org/10.1128/aem.64.5.1822-1824.1998>

Rosy, J.C., Babkiewicz, E., Maszczyk, P., Mrówka, P., Kumar, B.K., Murugesan, S., Kunjiappan, S., Sundar, K. 2022. L-OrnithineN5-monooxygenase (PvdA) Substrate Analogue Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa* Infections Treatment: Drug Repurposing Computational Studies. *Biomolecules* 12, 887. <https://doi.org/10.3390/biom12070887>

Roy, M.C., Chowdhury, T., Hossain, M.T., Hasan, M.M., Zahran, E., Rahman, M.M., Zinnah, K.M.A., Rahman, M.M., Hossain, F.M.A. 2024. Zoonotic linkage and environmental contamination of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy farms: A one health perspective. *One Health* 18, 100680. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100680>

Ruíz, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona. ISBN 9788469127490.

Ru-Sa

Ruiz, L. 2020. *Epidemiología molecular de Staphylococcus spp. desde un enfoque One Health: genes emergentes e inusuales de resistencia a antibióticos y de virulencia*. Tesis Doctoral, Universidad de la Rioja, Logroño.

Ruiz-Ginés, M., Fuentes-Bullejos, P., Ruiz-Ginés, J., Picazo-Perea, M., Lopez-Martos, A., Sagredo-Rioc, M., Recio-Montealegrec, J., Lorenzo-Lozano, B. 2019. Dangerous waters: Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* or “brain-eating” amoeba: First case described in Spain. *Clinica Chimica Acta* 493, S199–S200. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.03.528>

Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Sala-Comorera, L., Blanch, A.R., Vilaró, C., Galofré, B., García-Aljaro, C. 2016. *Pseudomonas*-related populations associated with reverse osmosis in drinking water treatment. *Journal of Environmental Management* 182, 335–341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.089>

Samuelsson, J., Hallström, L.P., Marrone, G., Dias, J.G. 2023. Legionnaires’ disease in the EU/EEA*: increasing trend from 2017 to 2019. *Eurosurveillance* 28 (11). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.11.2200114>

Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J.C., De la Fe, C. 2022. En el principio fue la zoonosis: *One Health* para combatir esta y futuras pandemias. Informe SESPAS 2022. *Gaceta Sanitaria* 36 (S1), S61–S67. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2022.01.012>

Sánchez-Jiménez, A., Llamas, M.A., Marcos-Torres, F.J. 2023. Transcriptional Regulators Controlling Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 11895. <https://doi.org/10.3390/ijms241511895>

Santamarina-García, G., Amores, G., Llamazares, D., Hernandez, I., Barron, L.J.R., Virto, M. 2024. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistances reveals the effect of the production chain in reducing resistant lactic acid bacteria in an artisanal raw ewe milk PDO cheese. *Food Research International* 187, 114308. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114308>

Sanz-García, F., Anoz-Carbonell, E., Pérez-Herrán, E., Martín, M., Lucía, A., Rodrigues, L., Aínsa, J.A. 2019. Mycobacterial Aminoglycoside Acetyltransferases: A Little of Drug Resistance, and a Lot of Other Roles. *Frontiers in Microbiology* 10, 46. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00046>

Sanz-Nieto, J.A., Medina-Pascual, M.J., Carrasco, G., Garrido, N., Fernandez-Torres, M.A., Villalón, P., Valdezate, S. 2017. *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbe and New Infect* 2017; 19: 19–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.006>

Sarink, M.J., Pirzadian, J., van Cappellen, W.A., Tielens, A.G.M., Verbon, A., Severin, J.A., van Hellemond, J.J. 2020. *Acanthamoeba castellanii* interferes with adequate chlorine disinfection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Hospital Infection* 106, 490–494. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.09.019>

Saticioglu, I.B., Duman, M., Altun, S. 2018. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Pantoea agglomerans* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Microbial Pathogenesis* 119, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.022>

Sa-Se

- Sauvage, E. y Terrak, M. 2016. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics* 5 (1), 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5010012>
- Savini, V., Catavittello, C., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Bianco, A., Febbo, F., D'Amario, C., D'Antonio, D. 2010. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *Journal of Medical Microbiology* 59, 1395–402. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021709-0>
- Scaglia, M., Strosselli, M., Grazioli, V., Gatti, S., Bernuzzi, A.M., de Jonckheere, J.F. 1983. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, *Vahlkampfiidae*) from a spa in northern Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (6), 1282–1285. <https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1282-1285.1983>
- Scheid, P. 2014. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitology Research* 113, 2407–2414. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3932-7>
- Schoenfelder, S.M.K., Dong, Y., Fessler, A.T., Schwarz, S., Schoen, C., Köck, R., Ziebuhr, W. 2017. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Veterinary Microbiology* 200, 79–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.019>
- Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A., Byers, T. J. 2001. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1903–1911. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001>
- Schwab, M., Brockmann, M., Stumpf, P., Pfabe, J., Muller, E., Pees, M., Marschang, R.E.E. 2024. Isolation of aerobic bacteria from abscesses and wounds in rabbits and antibiotic susceptibility testing of *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. isolates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 49, 41–47. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2024.03.009>
- Scott, L.C., Lee, N., Aw, T.G. 2020. Antibiotic Resistance in Minimally Human-Impacted Environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, 3939. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113939>
- Selvaraj G.K., Wang, H., Zhang, Y., Tian, Z., Chai, W., Lu, H. 2022. Class 1 In-Tn5393c array contributed to antibiotic resistance of nonpathogenic *Pseudoxanthomonas mexicana* isolated from a wastewater bioreactor treating streptomycin. *Science of the Total Environment* 821, 153537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153537>
- Semenov, A.V., Van Overbeek, L., Van Bruggen, A.H. 2009. Percolation and survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 3206–3215. <https://doi.org/10.1128/AEM.01791-08>
- Senesi, S., Celandroni, F., Tavanti, A., Ghelardi, E. 2001. Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2), 834–839. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.834-839.2001>
- Servais, P. y Passerat, J. 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment* 408, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.042>

Sh-Si

- Sharma, M., Dogra, B.B., Misra, R., Gandham, N., Sardar, Moumita, Jadhav, S. 2012. Multidrug Resistant *Pantoea agglomerans* in a patient with septic arthritis- A rare report from India. *International Journal of Microbiology Research* 4 (6), 263–265. ISSN: 0975-5276. <https://doi.org/10.9735/0975-5276.4.6.263-265>
- Sharma, P., Diene, S.M., Thibeaut, S., Bittar, F., Roux, V., Gomez, C., Reynaud-Gaubert, M., Rolain, J.M. 2013. Phenotypic and genotypic properties of *Microbacterium yannicii*, a recently described multidrug resistant bacterium isolated from a lung transplanted patient with cystic fibrosis in France. *BMC Microbiology* 13 (97). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-97>
- Sharma, S., Gupta, A., Rao, D. 2015. *Paenibacillus Lautus*: A rare cause of Bacteremia and Review of Literature. *Indian Journal of Medical Case Reports* 4 (2). ISSN: 2319-3832.
- Sharma-Kuinkel, B.K., Mann, E.E., Ahn, J.S., Kuechenmeister, L.J., Dunman, P.M., Bayles, K. W. 2009. The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 191 (15), 4767–4775. <https://doi.org/10.1128/JB.00348-09>
- Shaw, K.J., Eather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiological Reviews* 57 (1), 138–163. <https://doi.org/10.1128/mr.57.1.138-163.1993>
- Shen, Y., Luo, J., Di Cesare, A., Guo, N., Zou, S., Yang, Y. 2024. Performance evaluation for the inactivation of multidrug-resistant bacteria in wastewater effluent by different disinfection technologies. *Environmental Pollution* 345, 123427. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123427>
- Shin, J., Magar, K.B.S., Lee, J., Kim, K., Lee, Y.R. 2019. Design, synthesis, and discovery of novel oxindoles bearing 3-heterocycles as species-specific and combinatorial agents in eradicating *Staphylococcus* species. *Scientific Reports* 9, 8012. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44304-1>
- Shirshikova, T.V., Sierra-Bakhshi, C.G., Kamaletdinova, L.K., Matrosova, L.E., Khabipova, N.N., Evtugyn, V.G., Khilyas, I.V., Danilova, I.V., Mardanova, A.M., Sharipova, M.R., Bogomolnaya, L.M. 2021. The ABC-type efflux pump MacAB is involved in protection of *Serratia marcescens* against aminoglycoside antibiotics, polymyxins, and oxidative stress. *mSphere* 6: e00033-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00033-21>
- Shu, L., Zhang, B., Queller, D.C., Strassmann, J.C. 2018. *Burkholderia* bacteria use chemotaxis to find social amoeba *Dictyostelium discoideum* hosts. *The ISME Journal* 12, 1977–1993. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0147-4>
- Sichel, C., Fernández-Ibáñez, P., de Carac, M., Tello, J. 2009. Lethal synergy of solar UV-radiation and H₂O₂ on wild *Fusarium solani* spores in distilled and natural well water. *Water Research* 41, 1841–1850. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.017>
- Siddiqui, R. y Khan, N.A. 2012. War of the microbial worlds: Who is the beneficiary in Acanthamoeba–bacterial interactions? *Experimental Parasitology* 130, 311–313. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.021>
- Sidrach-Cardona, R., Hijosa-Valsero, M., Marti, E., Balcázar J.L., Becares, E. 2014. Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. *Science of the Total Environment* 488–489, 220–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.100>

Si-So

Siedlecka, A., Wolf-Baca, M.J., Piekarska, J. 2021. Antibiotic and Disinfectant Resistance in Tap Water Strains – Insight into the Resistance of Environmental Bacteria. *Polish Journal of Microbiology* 70 (1), 57–67. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-004>

Sierra, J.M. 2005. *Bases Moleculares de la Resistencia a Quinolonas en Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae y Corynebacterium spp.* Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona. ISBN 8469001450.

Silley, P., Goby, L., Pillar, C.M. 2012. Susceptibility of coagulase-negative staphylococci to a kanamycin and cefalexin combination. *Journal of Dairy Science* 95 (6), 3448–3453. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5032>

Silva, K.J. y Sagobal-Paz, L.P. 2021. Exploring Potentials and Constraints of H₂O₂ Water Disinfection for Household Settings. *Water, Air, & Soil Pollution* 232, 483. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05434-3>

Silva, K.J. y Sagobal-Paz, L.P. 2022. A 10-year critical review on hydrogen peroxide as a disinfectant: could it be an alternative for household water treatment? *Water Supply* 22, 8527. <https://doi.org/10.2166/ws.2022.384>

Singh, B.K., Biswas, R., Bhattacharyya, S., Basak, A., Das, A.K. 2022. The C-terminal end of mycobacterial HadBC regulates AcpM interaction during the FAS-II pathway: a structural perspective. *The FEBS Journal* 289 (16), 4963–4980. <https://doi.org/10.1111/febs.16405>

Sivaganesan, M., Rice, E.W., Mariñas, B.J. 2003. A Bayesian method of estimating kinetic parameters for the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide and ozone. *Water Research* 37, 4533–4543. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00412-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00412-3)

Sivarman, U., Subramanian, P., Ramakrishnan, K., Seetha, K.S. 2016. Umbilical Sepsis Caused by Multidrug Resistant Strain of *Kocuria kristinae* in a New Born: A Case Report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10 (4), DD01–DD02. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15665.7560>

Smith, D.D.N., Nickzad, A., Déziel, E., Stavrinides, J. 2016. A novel glycolipid biosurfactant confers grazing resistance upon *Pantoea ananatis* BRT175 against the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *mSphere* 1 (1), e00075-15. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00075-15>

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2000a. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: J.J. Picazo. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España: SEIMC. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia>

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2000b. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: J.J. Picazo. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España: SEIMC. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia>

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. En: E. Cercenado y R. Cantón. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España: SEIMC. ISBN-978-84-615-4094-5. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia>

So-St

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2018. *Registro Hospitalario de Pacientes Afectados por las Resistencias Bacterianas*. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/noticias/2018/seimc-Registro de Pacientes BMR.pdf>

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2021. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. En: E. Cercenado, R. Cantón. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid (España): SEIMC. ISBN: 978-84-09-31350-1. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia>

Sociedad Española de Quimioterapia. 2006. *Antimicrobianos en medicina*. J.A. García. Madrid (España): Sociedad Española de Quimioterapia. ISBN: 8481242403.

Soltan-Dallal, M.M., Rajabi, Z., Mirbagheri, S.Z., Keyvanlou, M., Didar, Z. 2023. Characterisation of antibiotic resistant *Staphylococcus* species and molecular identification of *mecA* and toxic shock syndrome toxin-1 (*tsst-1*) genes of *Staphylococcus aureus* isolates from cows' milk. *International Dairy Journal* 147, 105762. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105762>

Song, S., Han, M., Wang, X., Wang, S., Qin, W., Zhang, Y., Liu, Y., Sun, X. 2023. Fate of antibiotic resistance genes in cultivation substrate and its association with bacterial communities throughout commercial production of *Agaricus bisporus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 249, 114360. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114360>

Sorum, M., Johnsen, P.J., Aasnes, B., Rosvoll, T., Kruse, H., Sundsfjord, A., Simonsen, G.S. 2006. Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3 to 8 years after the ban on avoparcin. *Applied Environmental Microbiology* 72, 516–521. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.516-521.2006>

Soundararajan, M., Marincola, G., Liong, O., Marciniak, T., Wencker, F.D.R., Hofmann, F., Schollenbruch, H., Kobusch, I., Linnemann, S., Wolf, S.A., Helal, M., Semmler, T., Walther, B., Choen, C., Nyasinga, J., Revathi, G., Boelhauve, M., Ziebuhr, W. 2023. Farming Practice Influences Antimicrobial Resistance Burden of Non-Aureus Staphylococci in Pig Husbandries. *Microorganisms* 11, 31. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010031>

Soundhararajan, R. y Srinivasan, H. 2024. Multidrug-resistant *Bacillus* species isolated from hospital soil environment is controlled by nanobiotics incorporated nanoformulation. *Environmental Research* 246, 118122. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118122>

Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., Visvesvara, G.S. 2008. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (12), 4045–4048. <https://doi.org/10.1128/JCM.01903-08>

Stevens, A.R., De Jonckheere, J., Willaert, E. 1980. *Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *International Journal of Parasitology* 10 (1), 51–64. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(80\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(80)90064-8)

Stöllberger, C., Wechsler-Fördös, A., Geppert, F., Gulz, W., Brownstone, E., Nicolakis, M., Finsterer, J. 2006. *Staphylococcus warneri* endocarditis after implantation of a lumbar disc prosthesis in an immunocompetent patient. *Journal of Infection* 52 (1), e15–e18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.04.016>

St-Tc

Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J., Stenström, T.A. 2004. The Efficacy of Heat and Chlorine Treatment against Thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 36, 656–662. <https://doi.org/10.1080/00365540410020785>

Strassmann, J.E. y Shu, L. 2017. Ancient bacteria–amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. *PLoS Biology* 15 (5), e2002460. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002460>

Strober, W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology* 21 (1), Appendix 3A–3B. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>

Su, K., Wang, Y., Liu, Y., Liu, M., Men, X., Zhang, H., Xian, M., Wu, Z., Fu., C. 2023. Screening of *Bacillus altitudinis* D47 from TNT red water-contaminated soil for highly dinitrotoluene sulfonate efficient biodegradation. *Journal of Cleaner Production* 407, 137103. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137103>

Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Lin, W.Y. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 803–809. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.018>

Sun, H., Bjerketorp, J., Levenfors, J.J., Schnürer, A. 2020. Isolation of antibiotic-resistant bacteria in biogas digestate and their susceptibility to antibiotics. *Environmental Pollution* 266, 115265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115265>

Suzuki, N., Purba; F.Y., Inagawa, H., Hattori, Y., Isobe, N. 2023. Effects of oral administration of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* on innate immunity of mammary glands in dairy goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 265, 110664. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110664>

Sweeney, P., Galliford, A., Kumar, A., Raju, D., Krishna, N.B., Sutherland, E., Leo, C.J., Fisher, G., Lalitha, R., Muthuraj, L., Sigamani, G., Oehler, V., Synowsky, S., Shirran, S.L., Gloster, T.M., Czekster, C.M., Kumar, P., Silva, R.G. 2022. Structure, dynamics, and molecular inhibition of the *Staphylococcus aureus* m1 A22-tRNA methyltransferase TrmK. *Journal of Biological Chemistry* 298 (6), 102040. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102040>

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2 (2), 70–78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38 (7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Tardón, A., Bataller, E., Llobat, L., Jimenez-Trigos, E. 2021. Bacteria and antibiotic resistance detection in fractures of wild birds from wildlife rehabilitation centres in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 74, 101575. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101575>

Tchuente, P.L.S., Stalder, T., Venditti, S., Ngandjio, A., Dagot, C., Ploy, M.C., Barraud, O. 2016. Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *International Journal of Antimicrobial Agents* 48, 431–434. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.018>

Te-Tr

- Terán, M.C. 2016. *Estudio de la Aplicación de Procesos de Oxidación Avanzada a Aguas Contaminadas*. Trabajo de Fin de Grado, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona. Disponible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/88273/01_TFG.pdf
- Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., Greub, G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology* 10 (10), 2728–2745. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01693.x>
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.Y. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 231–259. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x>
- Thomas, V. 2013. Sensitivity and Resistance of Protozoa to Microbicides. En: A.P. Fraise, J.Y. Maillard, S.A. Sattar. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. Nueva Jersey (Estados Unidos): Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 9781405101998.
- Tillett, H.E. y Coleman, R. 1985. Estimated numbers of bacteria in samples from non-homogeneous bodies of water: how should MPN and membrane filtration results be reported? *Journal of Applied Bacteriology* 59 (4), 381–388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb03334.x>
- Tillett, H.E. 1987. Most probable number of organisms: revised tables for the multiple tube method. *Epidemiology & Infection* 99, 471–476. <https://doi.org/10.1017/s0950268800067972>
- Tolba, M.E.M., Huseein, E.A.M., Farrag, H.M.M., Mohamed, H.E.D., Kobayashi, S., Suzuki, J., Ali, T.A.M., Sugano, S. 2016. *Allovalhikampfia spelaea* Causing Keratitis in Humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (7), e0004841. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004841>
- Toribio, J., Escalante, A.E., Caballero-Mellado, J., González-González, A., Zavala, S., Souza, V., Soberón-Chávez, G. 2011. Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.01.007>
- Torres, C. y Cercenado, E. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28 (8), 541–553. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.003>
- Totaro, M., Badalucco, F., Papini, F., Grassi, N., Mannocci, M., Baggiani, M., Tuvo, B., Casini, B., Menchini Fabris, G.B., Baggiani, A. 2022. Effectiveness of a Water Disinfection Method Based on Osmosis and Chlorine Dioxide for the Prevention of Microbial Contamination in Dental Practices. *International Journal of Environmental Research & Public Health* 19, 10562. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710562>
- Tovar, O.L. 2006. *Aislamiento e identificación de amebas de vida libre en el Sistema de agua del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” y su interrelación con Legionella pneumophila*. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- Trisolini, L., Gambacorta, N., Gorgoglione, R., Montaruli, M., Laera, L., Colella, F., Volpicella, M., De Grassi, A., Pierri, C.L. 2019. FAD/NADH Dependent Oxidoreductases: From Different Amino Acid Sequences to Similar Protein Shapes for Playing an Ancient Function. *Journal of Clinical Medicine* 8, 2117. <https://doi.org/10.3390/jcm8122117>

Ts-Vi

- Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, M.S., Müller, N. 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology Research*. 92 (5), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1052-x>
- Tuipulotu, D.E., Mathur, A., Ngo, C., Man, S.M. 2021. *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host–Pathogen Interactions. *Trends in Microbiology* 29 (5), 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>
- Uniprot. 2024. *Find your protein*. Disponible en: <https://www.uniprot.org/>
- Valero, P. 2017. *Regeneración de aguas de salida de depuradora mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación*. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. ISSN 2254-7606.
- Van der Loo, C., Bartir, C., Barnard, T.G., Potgieter, N. 2021. Detection of Free-Living Amoebae and Their Intracellular Bacteria in Borehole Water before and after a Ceramic Pot Filter Point-of-Use Intervention in Rural Communities in South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 118, 3912. <https://doi.org/10.3390/ijerph18083912>
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., Manaia, C.M. 2012. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of the Total Environment* 426, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.046>
- Vázquez, L., Srednik, M.E., Rodríguez, J., Flórez, A.B., Mayo, B. 2023. Antibiotic Resistance/Susceptibility Profiles of *Staphylococcus equorum* Strains from Cheese, and Genome Analysis for Antibiotic Resistance Genes. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 11657. <https://doi.org/10.3390/ijms241411657>
- Velázquez-Meza, M.E., Galarde-López, M., Carrillo-Quiróz, B., Alpuche-Aranda, C.M. 2022. Antimicrobial resistance: One Health approach. *Veterinary World* 15 (3), 743–749. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.743-749>
- Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R.I., Provot, C., Popowska, M., Desvaux, M. 2019. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00331>
- Vieira, A., Ramesh, A., Seddon, A.M., Karlyshev, A.V. 2017. CmeABC multidrug efflux pump contributes to antibiotic resistance and promotes *Campylobacter jejuni* survival and multiplication in *Acanthamoeba polyphaga*. *Applied Environmental Microbiology* 83:e01600-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01600-17>
- Vissers, M.M.M., Giffel, M.C.T., Driehuis, F., De Jong, P., Lankveld, J. M. G. 2007. Minimizing the Level of *Bacillus cereus* Spores in Farm Tank Milk. *Journal of Dairy Science* 90, 3286–3293. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-873>
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 50, 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>

Vi-Wo

Visvesvara, G.S., Sriram, R., Qvarnstrom, Y., Bandyopadhyay, K., Da Silva, A.J., Pieniazek, N.J., Cabral, G.A. 2009. *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56, 357–366. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00410.x>

Walochnik, J., Picher, O., Aspöck, C., Ullmann, M., Sommer, R., Aspöck, H. 1999, Interactions of 'Ilimax amoebae' and Gram-negative bacteria: experimental studies and review of current problems. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* 23 (6), 273–278.

Walterson, A.M. y Stavriniades, J. 2015. Insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Reviews* 39 (6), 968–984. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>

Wang, C., Sui, Z., Leclercq, S.O., Zhang, G., Zhao, M., Chen, W., Feng, J. 2015. Functional characterization and phylogenetic analysis of acquired and intrinsic macrolide phosphotransferases in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology* 17 (5), 1560–1573. 2015. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12578>

Wang, Z. y Wu, M. 2017. Comparative Genomic Analysis of *Acanthamoeba* Endosymbionts Highlights the Role of Amoebae as a “Melting Pot” Shaping the *Rickettsiales* Evolution. *Genome Biology and Evolution* 9 (11), 3214–3224. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx246>

Wang, J., Sui, W., Yuan, B., Li, H., Lu, H. 2019. Inactivation of two mycobacteria by free chlorine: effectiveness, influencing factors, and mechanisms. *Science of the Total Environment* 648, 271–284. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.451>

Wang, S.C, Davejan, P., Hendargo, K.J., Javadi-Razaz, I., Chou, A., Yee, D.C., Ghazi, F., Lam, K.J.K., Conn, A.M., Madrigal, A., Medrano-Soto, A., Saier, M.H. 2020. Expansion of the Major Facilitator Superfamily (MFS) to include novel transporters as well as transmembrane-acting enzymes. *BBA - Biomembranes* 1862, 183277. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183277>

Wang, L., Mai, Y., Li, S., Shu, L., Fang, J. 2023a. Efficient inactivation of amoeba spores and their intraspore bacteria by solar/chlorine: Kinetics and mechanisms. *Water Research* 242, 120288. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120288>

Wang, Y., Jiang, L., Zhao, Y., Ju, X., Wang, L., Jin, L., Fine, R.D., Li, M. 2023b. Biological characteristics and pathogenicity of *Acanthamoeba*. *Frontiers in Microbiology* 14, 1147077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1147077>

Wardell, R. 2014. Antimicrobial resistance: a “wicked problem” affecting today’s society. Disponible en: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:39420017>

Wendlandt, S., Kadlec, K., Fessler, A.T., Schwarz, S. 2015. Identification of ABC transporter genes conferring combined pleuromutilin–lincosamide–streptogramin A resistance in bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Veterinary Microbiology* 177, 353–358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.027>

Wingender, J. y Flemming, H.C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>

Woodford, N. 2005. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology and Infection* 11 Suppl 3, 2-21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01140.x>

Wo-Za

- Woyda-Ploszczyca, A., Koziel, A., Antos-Krzeminska, N., Jarmuszkiewicz, W. 2011. Impact of oxidative stress on *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial bioenergetics depends on cell growth stage. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 43, 217–225 <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9351-x>
- Wu, S., Zheng, H., Wang, Y., Wang, L., Chen, W. 2023. Cyanobacterial bioreporter of nitrate bioavailability in aquatic ecosystems. *Water Research* 247, 120749. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120749>
- Wullich, S.C., San Martín, A.A., Fetzner, S. 2020. An α/β -Hydrolase Fold Subfamily Comprising *Pseudomonas* Quinolone Signal-Cleaving Dioxygenases. *Enzymology and Protein Engineering* 86 (9), e00279-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00279-20>
- Yadav, S. y Khosla, B. 2021. Biodegradation of poultry feather waste by keratinase producing *Bacillus cereus* strain isolated from poultry farms waste disposal site. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* 4, 100114. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100114>
- Yakovlieva, L. y Walvoort, M.T.C. 2020. Processivity in Bacterial Glycosyltransferases. *ACS Chemical Biology* 15, 3-16. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00619>
- Yamabe, S. 1980. Inhibitory effects of aminoglycoside antibiotics on reduction of cytochrome c from *Candida krusei*. *Chemotherapy* 26 (1), 28-35. <https://doi.org/10.1159/000237880>
- Yi, L., Chen, S., Li, G., Ren, J., Zhou, R., Zeng, K. 2022. Prevalence of antibiotic resistance pathogens in online fresh-cut fruit from Chongqing, China and controlling *Enterococcus faecalis* by bacteriocin GF-15. *LWT - Food Science and Technology* 165, 113678. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113678>
- Yi, S., Song, H., Kim, W.H., Lee, S., Guk, J.H., Woo, J.H., Cho, S. 2024. Dynamics of microbiota and antimicrobial resistance in on-farm dairy processing plants using metagenomic and culture-dependent approaches. *International Journal of Food Microbiology* 417, 110704. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110704>
- Yip, E.S., Burnside, D.M., Cianciotto, N.P. 2011. Cytochrome c_4 is required for siderophore expression by *Legionella pneumophila*, whereas cytochromes c_1 and c_5 promote intracellular infection. *Microbiology* 157, 868–878. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046490-0>
- Yoon, J. y Runnegar, N. 2019. *Staphylococcus pasteurii* infective endocarditis: A case report Jaineel Ramnarain. *IDCases* 18, e00656. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00656>
- Yousefi, M., Ahmadifar, M., Mohammadzadeh, S., Kalhor, N., Esfahani, D.E., Bagheri, A., Mashhadizadeh, N., Moghadam, M.S., Ahmadifar, E. 2022. *Fish & Shellfish Immunology* 127, 1070–1078. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.07.015>
- Yuan, L., Sadiq, F.A., Liu, T., Flint, S., Chen, J., Yang, H., Gu, J., Zhang, G., He, G. 2017. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk. *LWT – Food Science and Technology* 84, 409–418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.023>
- Yuranova, T., Enea, O., Mielczarski, E., Mielczarski, J., Albers, P., Kiwi, J. 2004. Fenton immobilized photo-assisted catalysis through a Fe/C structured fabric. *Applied Catalysis B: Environmental* 49, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2003.11.008>
- Zárate, S.G., Claire, M.D.C., Benito-Arenas, R., Revuelta, J., Santana, A.G., Bastida, A. 2018. Overcoming Aminoglycoside Enzymatic Resistance: Design of Novel Antibiotics and Inhibitors. *Molecules* 23, 284. <https://doi.org/10.3390/molecules23020284>

Ze-Zo

Zeng, F., Cao, S., Jin, W., Zhou, X., Ding, W., Tu, R., Han, S., Wang, C., Jiang, Q., Huang, H., Ding, F. 2020. Inactivation of chlorine-resistant bacterial spores in drinking water using UV irradiation, UV/hydrogen peroxide and UV/peroxymonosulfate: efficiency and mechanism. *Journal of Cleaner Production* 243, 118666. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118666>

Zhai, Z., Cui, C., Li, X., Yan, J., Sun, E., Wang, C., Guo, H., Hao, Y. 2022. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and antibiotic resistance gene transfer of *Bacillus* strains isolated from pasteurized milk. *Journal of Dairy Science* 106, 75–83. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22199>

Zhang, S., Mukherji, R., Chowdhury, S., Reimer, L., Stallforth, P. 2021. Lipopeptide-mediated bacterial interaction enables cooperative predator defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 118 (6), e2013759118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013759118>

Zhang, Y., Zhang, N., Wang, M., Luo, M., Peng, Y., Li, Z., Xu, J., Ou, M., Kan, B., Li, X., Lu, X. 2023a. The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. *Biosafety and Health* 5, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2023.01.001>

Zhang, Y., Hu, Q., Li, Z., Kang, Z., Zhang, L. 2023b. *Kocuria* species: an underappreciated pathogen in pediatric patients—a single-center retrospective analysis of 10 years' experience in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 107 (4), 116078. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116078>

Zhao, Y., Gao, J., Wang, Z., Cui, Y., Zhang, Y., Dai, H., Li, D. 2022. Distinct bacterial communities and resistance genes enriched by triclocarban-contaminated polyethylene microplastics in antibiotics and heavy metals polluted sewage environment. *Science of the total Environment* 839, 156330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156330>

Zhou, P., Di Giovanni, G.D.D., Meschke, J.S., Dodd, M.C. 2014. Enhanced Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts during Solar Photolysis of Free Available Chlorine. *Environmental Science & Technology Letters* 1, 453–458. <https://doi.org/10.1021/ez500270u>

Zhou, Y., Yang, J., Yuc Y., Tang, Y. 2024. A novel glycosyltransferase from *Bacillus subtilis* achieves zearalenone detoxification by diglycosylation modification. *Food & Function* 11. <https://doi.org/10.1039/D4FO00872C>

Zou, Q., Cai, M., Hu, Y., Ge, Y., Wang, X., Duan, R. 2024. *Bacillus licheniformis* bloodstream infections associated with oral probiotic administration: Two case reports. *Indian Journal of Medical Microbiology* 47, 100485. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2023.100485>

ANEXO I

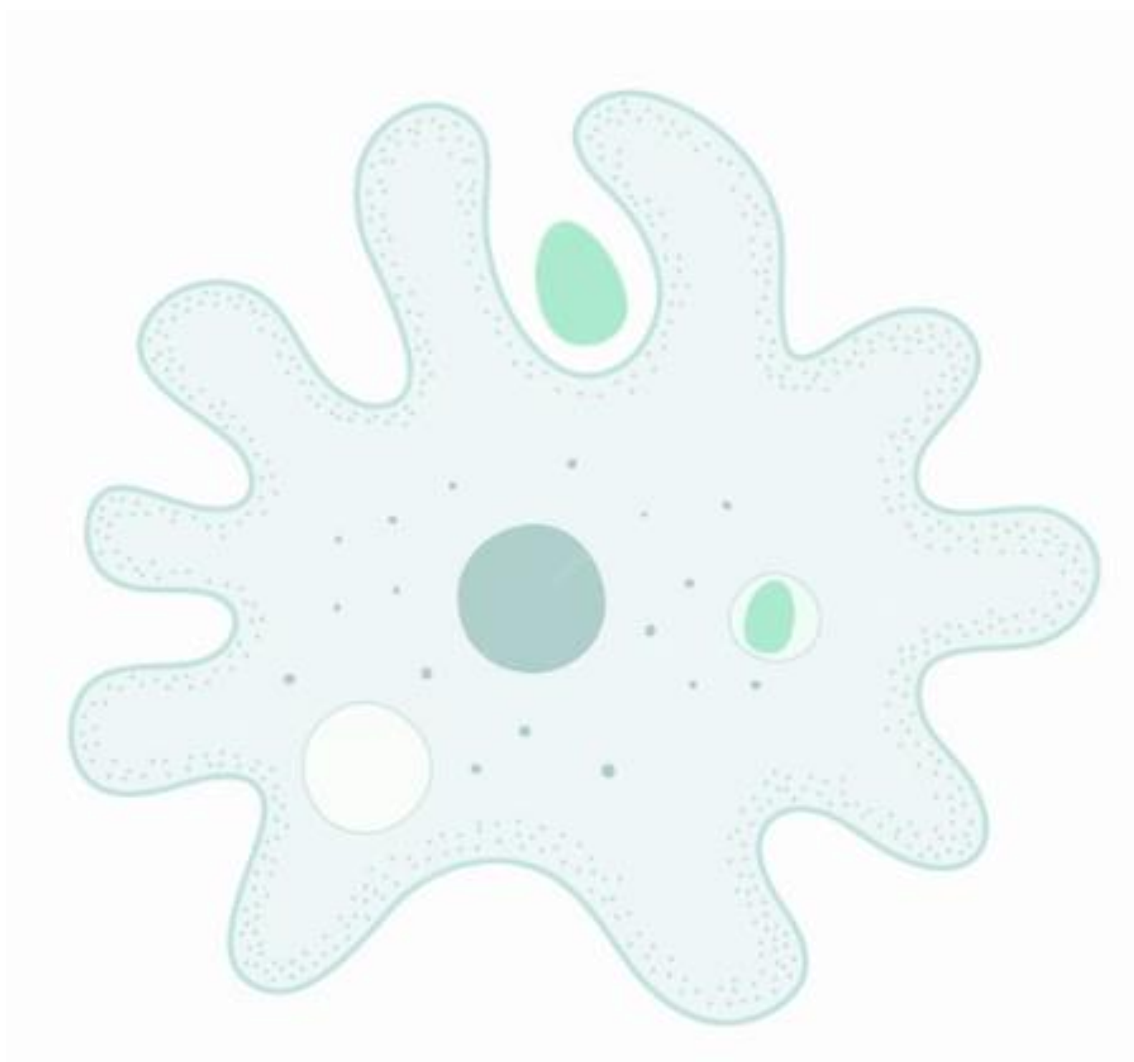


Tabla A.1. Halos (mm) de inhibición de las bacterias endocitobiontes en presencia de antibióticos representativos de diferentes familias.

AVL	BE	AMP	OX	CRO	APR	GMN	HYG	K	STR	AZM	E	CIP	NA	CL	MNO	RA	SXT
1111	34	15	0	43	0	9	0	13	13	13	11	28	0	31	42	35	34
1111	39 ^{GM}	20	0	24	25	0	0	10	0	36	21	40	48	48	52	46	14
112	1	20	40	58	36	42	10	38	33	35	39	80	21	36	38	48	40
1113	1	26	20	32	20	25	0	27	21	32	31	31	16	33	31	39	35
1113	2	19	0	20	22	36	13	18	0	0	0	32	36	30	42	46	45
1113	7	17	0	22	31	30	7	23	0	0	0	27	27	40	44	54	45
1113	8 ^{AMP}	8	0	11	19	20	0	20	18	17	15	26	21	21	21	15	0
1113	9 ^{AMP}	15	0	12	23	36	13	16	0	0	8	19	21	26	38	43	42
1113	10	30	0	10	34	35	24	22	0	14	12	27	25	30	42	45	45
1113	11	17	0	18	25	36	14	17	0	0	0	33	32	23	42	45	45
1113	12	25	0	20	28	33	8	15	0	0	0	29	24	26	40	45	43
1113	13 ^{AMP}	15	0	14	23	29	11	18	0	0	0	26	25	27	40	48	41
1113	14	21	0	18	28	36	11	0	0	0	0	28	30	28	45	48	48
1113	15	14	0	12	30	33	9	18	0	0	0	24	25	27	45	50	45
1113	16	26	0	17	31	33	8	17	0	0	0	26	28	31	47	50	45
1113	17 ^{AMP}	9	0	40	24	29	0	0	0	14	0	42	40	12	15	22	36
1113	18	24	0	17	30	36	10	22	8	0	0	32	30	30	46	50	44
13	1 ^{AMP}	9	0	21	19	26	0	25	19	0	0	37	22	32	26	45	21
141	1	19	0	22	23	32	7	29	15	33	21	40	26	35	38	28	45
141	2	19	7	20	24	35	7	32	18	35	23	45	24	37	42	30	44
141	3	21	13	25	19	30	0	33	20	34	22	44	28	39	40	30	43
141	4	20	7	23	24	33	0	33	15	36	22	42	33	37	42	32	45
141	5	23	7	25	24	38	7	38	21	35	24	43	23	35	38	33	44

AMP: ampicilina; AP: apramicina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; GMN: gentamicina; HYG: higromicina; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidíxico; OX: oxacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina. “-”: no se ha evaluado. ^{AMP}: aislada en MH-AMP. ^{APR}: aislada en MH-APR. ^{GM}: aislada en MH-GM.

Tabla A.1. Halos (mm) de inhibición de las bacterias endocitobiontes en presencia de antibióticos representativos de diferentes familias. *Continuación.*

AVL	BE	AMP	OX	CRO	APR	GMN	HYG	K	STR	AZM	E	CIP	NA	CL	MNO	RA	SXT
141	6	22	8	25	25	35	10	33	19	33	23	42	28	33	40	30	43
141	7	15	7	20	15	31	0	33	20	33	20	41	25	34	39	29	40
141	8	21	8	30	23	31	12	36	19	35	22	47	31	36	42	30	50
141	9	20	0	23	17	31	0	34	15	35	21	42	24	37	42	30	44
141	10	18	0	22	20	30	0	36	18	27	17	38	25	34	37	29	40
142	1 ^{APR}	27	8	22	0	26	10	15	10	27	30	21	0	35	25	35	22
142	2	18	0	26	15	22	0	14	0	12	13	26	13	14	12	15	26
142	3	32	0	25	20	21	0	21	20	23	27	10	8	28	29	20	24
142	8	24	15	32	22	28	0	32	21	32	30	37	22	35	38	42	39
211	1 ^{APR}	43	0	40	0	29	0	21	21	42	43	35	9	37	32	42	0
211	2 ^{APR}	42	0	44	0	32	0	23	24	46	48	42	18	46	37	48	0
211	3 ^{APR}	43	0	43	0	28	0	23	23	45	45	40	15	42	37	46	0
211	4 ^{APR}	45	0	43	0	29	0	22	22	44	41	40	17	44	34	49	0
211	5 ^{APR}	43	0	41	0	32	0	24	22	44	46	38	12	46	30	47	0
2121	1	27	0	34	19	31	0	28	18	11	9	34	23	36	32	43	38
2121	2	46	25	35	25	22	0	0	21	33	35	37	25	37	36	45	43
2121	3	47	22	36	25	22	0	0	22	34	35	38	28	39	35	48	22
2121	4	29	0	33	20	31	0	28	19	9	8	33	25	35	33	43	40
2121	5 ^{GM}	25	19	34	21	13	0	10	19	11	9	35	23	36	30	40	32
2121	6	28	8	34	21	33	0	30	19	11	9	37	24	35	33	43	41
2121	7 ^{GM}	0	0	22	7	15	0	7	0	36	26	43	45	44	45	38	33
2121	8	28	0	34	21	33	0	28	21	10	9	34	24	35	35	44	38
2121	9	28	0	35	20	33	0	28	18	12	8	35	23	36	35	44	40

AMP: ampicilina; AP: apramicina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; GMN: gentamicina; HYG: higromicina; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidíxico; OX: oxacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina. "-": no se ha evaluado. ^{AMP}: aislada en MH-AMP. ^{APR}: aislada en MH-APR. ^{GM}: aislada en MH-GM.

Tabla A.1. Halos (mm) de inhibición de las bacterias endocitobiontes en presencia de antibióticos representativos de diferentes familias. *Continuación.*

AVL	BE	AMP	OX	CRO	APR	GMN	HYG	K	STR	AZM	E	CIP	NA	CL	MNO	RA	SXT
2121	10	48	21	38	25	24	0	0	22	36	41	42	27	44	38	48	45
2121	11	27	0	34	21	32	0	29	18	12	8	37	25	37	35	47	39
2121	14	20	20	34	25	33	0	28	20	10	10	34	21	36	32	45	38
2121	15	30	19	34	26	32	0	30	19	8	8	36	27	37	36	43	40
2121	20	50	25	41	31	24	0	0	24	38	41	40	27	39	36	48	45
2121	21	53	25	40	25	24	0	0	23	37	38	43	26	38	37	52	48
2121	22 ^{GM}	0	0	15	20	12	0	9	0	33	23	38	42	47	41	40	32
2132	2 ^{AMP}	0	0	19	23	33	18	35	29	0	0	38	22	22	25	20	22
2132	3 ^{AMP}	21	0	28	30	36	7	32	21	0	0	42	29	32	36	45	35
2132	4	40	18	32	26	34	0	38	22	38	23	35	11	35	38	47	45
2132	5	45	11	25	23	30	0	27	19	36	22	33	0	31	34	43	40
2132	6	-	0	54	18	33	17	25	27	46	35	25	0	44	44	48	44
2132	7 ^{APR}	44	0	31	16	23	0	17	16	12	0	25	0	24	32	28	23
231	1	15	0	25	15	23	0	24	16	0	0	29	19	34	28	37	22
32	2	23	-	27	26	30	0	29	22	33	21	34	19	32	35	41	35
32	3	45	-	31	25	30	0	30	23	0	0	39	23	36	39	46	35
32	4 ^{AMP}	11	0	40	28	28	0	0	0	12	0	42	38	11	15	22	44
32	5 ^{GM}	24	-	36	22	9	23	25	22	34	18	36	28	35	35	50	43
32	7	21	-	18	30	49	34	32	28	18	9	29	27	25	38	14	36
35	1	13	0	35	35	34	0	30	30	34	24	42	9	37	23	41	8
4412	1 ^{APR}	33	0	42	8	32	0	29	23	42	39	28	0	48	55	55	38
4412	2	38	27	36	21	28	0	21	21	8	0	24	13	38	37	46	40
4412	3	44	27	38	28	34	0	26	24	0	0	40	18	40	38	50	40

AMP: ampicilina; AP: apramicina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; GMN: gentamicina; HYG: higromicina; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidíxico; OX: oxacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina. "-": no se ha evaluado. ^{AMP}: aislada en MH-AMP. ^{APR}: aislada en MH-APR. ^{GM}: aislada en MH-GM.

Tabla A.1. Halos (mm) de inhibición de las bacterias endocitobiontes en presencia de antibióticos representativos de diferentes familias. *Continuación.*

AVL	BE	AMP	OX	CRO	APR	GMN	HYG	K	STR	AZM	E	CIP	NA	CL	MNO	RA	SXT
4412	4	40	26	34	25	30	0	24	22	12	0	38	16	35	37	53	40
4412	5	-	23	36	20	30	0	22	22	11	0	40	14	35	37	50	42
521	1	45	8	47	12	35	9	21	25	60	46	34	18	46	44	50	42
521	2	28	15	22	24	28	9	32	25	24	27	32	0	22	27	39	29
521	3 ^{APR}	80	7	48	11	26	7	30	12	7	10	34	20	40	40	47	58
521	4	30	0	34	54	38	16	30	36	14	22	32	0	44	39	44	22
521	5	34	0	31	30	34	17	40	25	22	27	35	0	34	38	40	34
521	6	64	11	45	9	34	24	30	15	48	46	35	18	48	35	50	45
521	7 ^{AMP}	15	7	24	19	31	0	29	20	8	8	40	11	37	31	49	15
521	8	62	25	44	19	50	15	31	22	50	48	35	17	50	33	52	46
521	9 ^{AMP}	14	16	25	21	23	0	25	18	0	0	27	13	28	32	42	39
522	10 ^{APR}	36	13	42	7	28	8	21	17	9	8	28	0	40	35	45	37
522	11	48	40	42	11	30	16	28	22	20	18	34	0	44	28	45	40
522	12	40	12	44	0	25	15	16	22	41	38	31	0	44	42	52	36
522	22	0	0	35	0	21	9	17	13	0	0	21	0	14	41	24	30
5511	7 ^{APR}	18	0	52	12	34	8	25	20	14	7	35	0	29	50	35	44
5511	9	38	0	46	0	30	14	23	13	17	10	30	0	35	40	37	22
5511	10	32	0	28	23	27	0	28	12	10	7	31	28	19	32	34	39
5511	11	15	0	38	0	15	0	8	0	13	7	25	0	26	40	32	37
5511	14	32	20	21	20	24	7	26	23	26	21	34	27	26	35	28	40
5512	1 ^{APR}	41	0	44	9	31	11	23	10	22	15	32	10	34	43	36	40
5512	11	40	25	29	20	30	6	30	21	35	33	32	17	34	33	41	35
5512	14	31	15	20	20	24	0	26	21	24	23	33	25	26	30	28	40

AMP: ampicilina; AP: apramicina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacina; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; GMN: gentamicina; HYG: higromicina; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidíxico; OX: oxacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina. "-": no se ha evaluado. ^{AMP}: aislada en MH-AMP. ^{APR}: aislada en MH-APR. ^{GM}: aislada en MH-GM.

Tabla A.1. Halos (mm) de inhibición de las bacterias endocitobiontes en presencia de antibióticos representativos de diferentes familias. *Continuación.*

AVL	BE	AMP	OX	CRO	APR	GMN	HYG	K	STR	AZM	E	CIP	NA	CL	MNO	RA	SXT
5521	10	30	27	30	24	28	18	30	21	26	25	30	27	28	28	26	29
5521	11	33	18	23	27	25	9	28	23	26	24	35	27	29	33	30	43
62112	1 ^{AMP}	14	16	29	12	20	0	16	15	0	0	25	16	28	31	40	35
62112	2	31	16	35	18	38	0	30	20	8	11	35	8	40	41	48	50
62112	3	34	15	38	24	44	0	35	20	13	13	38	25	40	43	54	52
62112	4	34	15	39	24	38	0	34	21	13	12	39	14	39	43	55	31
62112	5	20	15	38	20	22	0	30	15	8	10	34	23	34	38	38	50
62112	8	50	17	30	31	22	10	39	32	37	40	42	8	39	35	48	45
62112	9	28	15	27	24	28	11	35	25	27	31	34	0	28	30	40	34
6212	1	26	25	34	24	35	0	32	28	21	0	44	25	40	42	50	40
622	1	24	0	28	0	29	0	23	23	52	50	46	0	42	42	44	0
642	1	46	0	31	15	30	15	26	26	20	16	27	8	36	33	44	34
643	1 ^{AMP}	21	14	31	20	26	0	30	21	33	-	34	20	33	29	42	35
643	2	8	0	19	17	24	0	25	18	0	-	33	19	31	20	44	16
643	3	10	0	20	19	26	0	26	19	10	-	34	25	33	32	45	22
643	4	20	8	30	20	26	0	30	20	32	-	33	19	32	31	42	36
643	5	32	0	28	18	26	0	26	19	33	-	32	27	32	28	45	43
643	6	34	0	28	19	26	0	27	20	32	-	35	24	30	30	44	38
72	1	18	13	20	27	30	0	32	26	11	0	41	0	36	40	27	46
72	7 ^{AMP}	9	0	45	28	34	0	12	0	23	0	45	43	15	25	23	48
72	10	33	0	51	32	46	26	45	41	56	40	45	12	42	60	62	46
72	11 ^{APR}	37	0	32	0	40	0	35	32	40	28	35	0	41	45	46	41
75	1	37	23	32	28	34	0	34	27	34	24	42	12	37	40	47	45

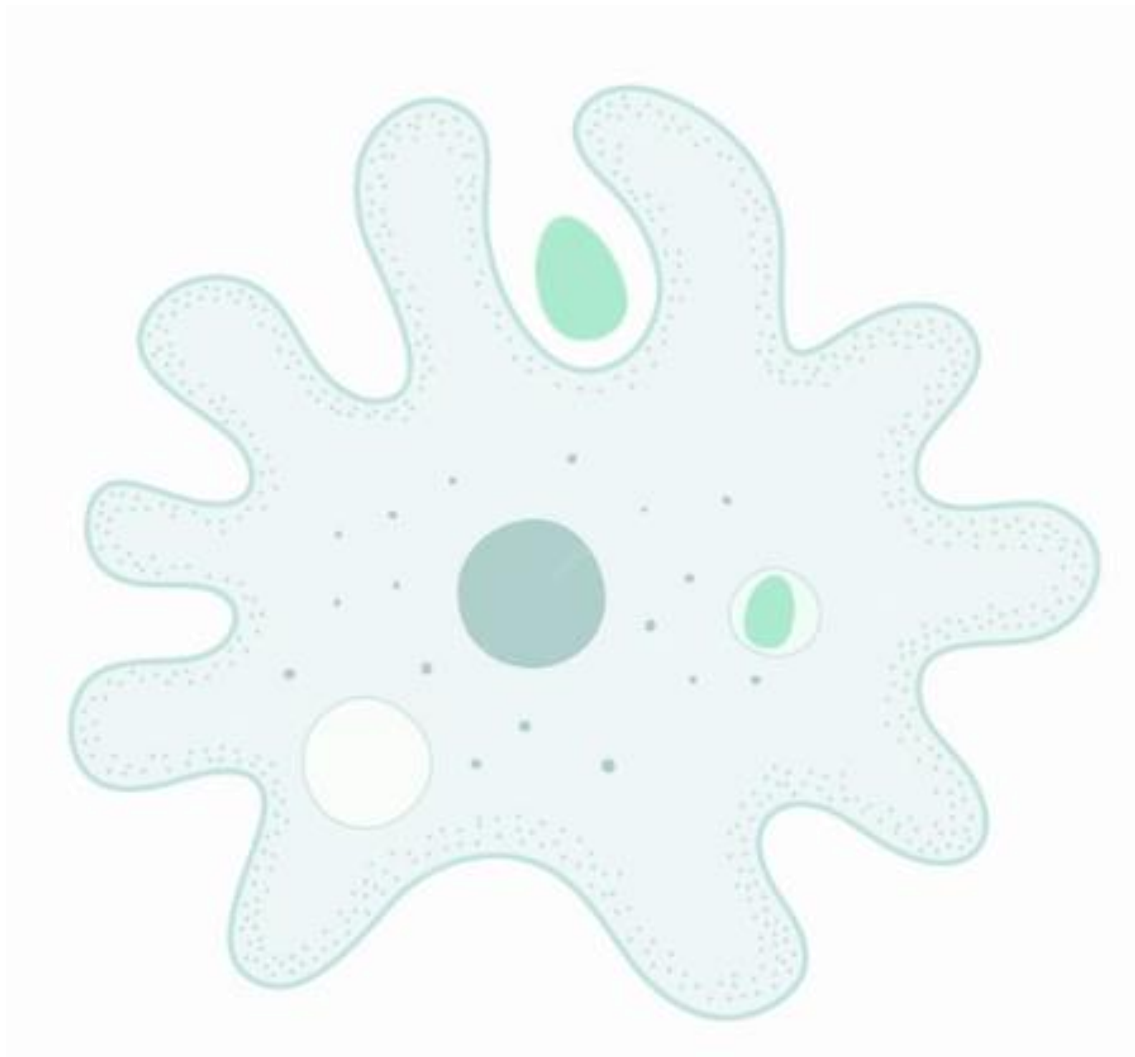
AMP: ampicilina; AP: apramicina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; GMN: gentamicina; HYG: higromicina; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidíxico; OX: oxacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina. "-": no se ha evaluado. ^{AMP}: aislada en MH-AMP. ^{APR}: aislada en MH-APR. ^{GM}: aislada en MH-GM.

Tabla A.1. Halos (mm) de inhibición de las bacterias endocitobiontes en presencia de antibióticos representativos de diferentes familias. *Continuación.*

AVL	BE	AMP	OX	CRO	APR	GMN	HYG	K	STR	AZM	E	CIP	NA	CL	MNO	RA	SXT
75	8	21	18	26	26	37	0	35	26	10	0	38	17	37	48	50	50
75	12	29	22	34	29	36	11	32	25	33	35	36	26	38	40	43	38
75	14	44	26	35	27	33	10	26	20	34	38	41	30	36	36	46	44
75	20	38	20	38	28	38	0	33	18	15	14	36	24	36	44	49	38
2.11	1	-	-	15	24	31	0	29	23	0	0	38	20	34	40	50	24
2.11	3	28	-	35	29	35	0	35	28	14	9	46	32	41	46	52	42
2.11	4	31	-	38	28	32	0	30	23	36	36	38	30	38	38	46	43
2.11	5	27	-	35	26	34	0	31	24	33	35	40	26	35	38	46	43
2.11	6	28	-	35	25	33	0	33	25	18	0	45	31	43	42	51	42
2.14	1	25	-	34	25	32	0	32	25	15	8	41	29	40	44	50	40
2.14	2	29	-	35	30	35	0	34	26	16	0	46	34	43	47	52	46
2.152	2	32	-	40	31	33	18	32	25	36	44	44	32	40	40	48	38
2.152	4	26	-	27	25	33	0	30	24	36	35	40	32	37	40	46	38
2.161	2	33	-	28	23	34	0	34	23	40	23	41	0	41	42	48	49
2.161	3	30	-	40	29	35	0	33	28	38	23	43	31	38	43	50	46

AMP: ampicilina; AP: apramicina; AZM: azitromicina; CIP: ciprofloxacino; CL: cloranfenicol; CRO: ceftriaxona; E: eritromicina; GMN: gentamicina; HYG: higromicina; K: kanamicina; MNO: minociclina; NAL: ácido nalidíxico; OX: oxacilina; RA: rifampicina; ST: estreptomicina; SXT: trimetoprim-sulfadiazina. "-": no se ha evaluado. ^{AMP}: aislada en MH-AMP. ^{APR}: aislada en MH-APR. ^{GM}: aislada en MH-GM.

ANEXO II





Article

Chlorine Photolysis: A Step Forward in Inactivating *Acanthamoeba* and Their Endosymbiont Bacteria

Carmen Menacho ^{1,2,3,*}, Maria Soler ¹, Patricia Chueca ^{2,3}, Maria P. Ormad ^{1,3} and Pilar Goñi ^{2,3}

- ¹ Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, School of Engineering and Architecture, University of Zaragoza, C/María Luna 3, 50018 Zaragoza, Spain; maria12losolmos@gmail.com (M.S.); mpmad@unizar.es (M.P.O.)
 - ² Area of Parasitology, Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, C/Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain; pachueca@unizar.es (P.C.); pgoni@unizar.es (P.G.)
 - ³ Water and Environmental Health Research Group, Environmental Science Institute (IUCA), University of Zaragoza, C/Pedro Cerbuna, 12, 50009 Zaragoza, Spain
- * Correspondence: cmenacho@unizar.es; Tel.: +34-976-761-154

Abstract: Chlorine and solar disinfection are widely used disinfectants in water treatment. However, certain potential pathogens can resist these methods, posing a public health risk. One such case is *Acanthamoeba*, a resistant free-living amoeba that protects pathogens inside from disinfection, thus endangering the health of water users. This work is the first evaluation of the inactivation efficiency achieved by combining NaClO (Cl₂) and solar radiation (SR) against two *Acanthamoeba* strains from different sources (freshwater and pool water) and their endosymbiont bacteria (EB). Amoebae were exposed to different Cl₂ doses (0–500 mg/L), SR wavelength ranges (280–800 nm and 320–800 nm), used as gold standards, and their combinations. The EB exhibited resistance to conventional Cl₂ and SR treatments, requiring up to 20 times higher disinfectant doses than those needed to inactivate their protective *Acanthamoeba*. The pool strain and its EB demonstrated greater resistance to all treatments compared to the freshwater strain. Treatments with Cl₂ (5 mg/L)/SR_{280–800nm} completely inactivated both *Acanthamoeba* and EB of the freshwater strain, reducing up to 100 times the necessary Cl₂ doses, suggesting that chlorine photolysis is an attractive treatment for disinfecting freshwater and preventing waterborne diseases associated with *Acanthamoebae* and its EB.

Keywords: disinfection; UV chlorine photolysis; Advanced Oxidation Process; solar radiation; *Acanthamoeba*; endosymbiont bacteria



Citation: Menacho, C.; Soler, M.; Chueca, P.; Ormad, M.P.; Goñi, P. Chlorine Photolysis: A Step Forward in Inactivating *Acanthamoeba* and Their Endosymbiont Bacteria. *Water* **2024**, *16*, 668. <https://doi.org/10.3390/w16050668>

Academic Editors: Gang Wen, Shiquan Sun and Zhengqian Liu

Received: 11 January 2024

Revised: 9 February 2024

Accepted: 21 February 2024

Published: 24 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Safe water is necessary for public health, regardless of its use. Inadequate management can lead to water contamination, further impacting the health of millions of people [1]. For this reason, different disinfection methods have been developed as necessary processes to ensure safety in different water and reclaimed water uses [2]. Regulations also play a crucial role in ensuring safety by establishing microbiological and physicochemical requirements that water must meet to be suitable for its different usages. However, there are potentially pathogenic microorganisms capable of surviving disinfection treatments that are not routinely monitored [3]. That is the case with some Free-Living Amoebae (FLA).

FLA are ubiquitous protozoa that can act as opportunistic pathogens. They can cause, among others, amoebic keratitis, encephalitis, or even fatal meningoencephalitis, observed with *Naegleria fowleri* [4]. FLA primarily feed on bacteria, but some bacteria can survive within FLA, such as *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., or *Pseudomonas* spp. [5], becoming endosymbionts. Some species, such as *Vibrio cholerae* or *L. pneumophila*, can multiply within FLA [6], transforming them into potential reservoirs for pathogenic bacteria. Indeed, FLA are commonly known as “trojan horses” [7].

Usually, FLA undergo two different stages: the trophozoite, which is the metabolically active stage, and the cyst, the resistance stage. The encystation process involves the production of a robust, thick wall that confers huge resistance to the amoebae against harsh environmental conditions and disinfectants [8], enabling them to survive water treatments. Consequently, they have been frequently isolated from the effluents of wastewater treatment plants [9,10] and drinking water treatment plants [11]. Given their resistance to treatments, FLA and, more concerning, potentially pathogenic endosymbiont bacteria protected inside them can spread in reclaimed water [10], drinking water systems, swimming pools [12], hospital water systems [13], or fountains [14]. In these environments, endosymbiont bacteria can be released outside FLA and recolonize these locations, turning them into infective foci. Indeed, the swift recolonization of cooling, domestic, or hospital water systems by *Legionella* is suggested to be facilitated by FLA protection [13,15].

Efforts have been undertaken to develop water treatments capable of inactivating amoebae. However, most studies have concluded that conventional treatments are ineffective in inactivating amoebae, at least at the typical doses, established according to bacteria elimination criteria [16,17]. For example, chlorine, the most common disinfectant, is typically used in water processes at doses ranging from 1 to 5 mg/L. Nevertheless, some *Acanthamoeba* strains can survive concentrations exceeding 100 mg/L [18]. As an alternative to chemical disinfectants, solar radiation is used due to the germicidal power of ultraviolet (UV) radiation and thermal heating [2]. While 2.5 h of exposure to simulated solar radiation resulted in a 5-log reduction in *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa*, 8 h of treatment was ineffective against *A. polyphaga* cysts [19].

In addition, some studies proved that bacteria, when shielded by amoebae, resisted higher doses of conventional disinfectants compared to free bacteria. Kilvington and Price [20] and García et al. [21] found that *L. pneumophila* could resist several times higher NaOCl doses when protected by *A. polyphaga*. He et al. [22] proved that *Burkholderia* bacterium was not effectively inactivated by UV_{254nm} while inside *Dictyostelium discoideum* cysts, observing only a 1-log reduction at the same UV dose (20 W.s/m²) that could cause a 6-log reduction in the free bacteria.

There is a wide variety of environmental FLA that can reach artificial water systems, as well as a wide variety of endosymbiont bacteria that can undergo water treatments while protected inside amoebae. The potentially pathogenic bacteria carried by FLA are frequently more worrying than the amoeba itself, and may become more virulent during intra-amoebal life [6]. Additionally, FLA can transport antibiotic-resistant bacteria [23]. Thus, focusing disinfection research on these protected and hidden microorganisms becomes crucial. Moreover, the increase in reusing and regenerating water, particularly in regions with water scarcity, a situation exacerbated by climate change [1], reinforces the necessity to develop technologies capable of inactivating potential pathogens that may become recalcitrant in the urban water cycle.

Some alternative treatments have also been assessed, including ozone, chlorine dioxide, or monochloramine [16]. However, the combination of chlorine and solar radiation can become an interesting choice given that these are the most widely used water disinfection treatments worldwide [24] and their combination turns the disinfection process into an Advanced Oxidation Process (AOP). Oxidant species such as hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$), ozone (O_3), and chlorine radicals ($\text{Cl}\bullet$, $\text{Cl}_2\bullet^-$, $\text{ClO}\bullet$) can be generated in situ through chlorine photolysis at the UV wavelengths characteristic of natural sunlight [25]. These molecules are highly reactive and have a biocide effect [26]. Indeed, it has been demonstrated that sunlight-driven chlorine photolysis dramatically accelerates the inactivation of highly chlorine-resistant microorganisms such as *Cryptosporidium parvum* [24] and *Bacillus subtilis* endospores [27], attracting interest due to its efficiency and residual chlorine effect [26]. However, studies on the inactivation of amoebae by chlorine photolysis are limited, though interesting results have been found. Chauque and Rott [28] evaluated the effect of UV_{254nm} chlorine photolysis on *A. castellanii*, finding that cysts were inactivated after prolonged exposures (two rounds of 90 min) to 1.0 or 5.0 mg/L of NaClO photolysis.

Wang et al. [29] evaluated the effect of solar radiation/chlorine on *Dictyostelium discoideum* amoebae and *Burkholderia agricolaris* intracellular bacteria, finding a 5-log inactivation of both amoebae and bacteria after 20 min of 5 mg/L solar/chlorine treatment. Nevertheless, the effectiveness of chlorine photolysis against environmental endosymbiont bacteria has never been studied.

Acanthamoeba sp. is recognized as the amoeba genus most frequently found in the environment. In addition, it can cause human infections and can host numerous potentially pathogenic microorganisms, including intracellular bacteria [7], being one of the most resistant FLA genera reported [16]. Furthermore, results with *Acanthamoeba* can be extrapolated to other pathogenic protozoa that are equally or less resistant (and not as frequent as *Acanthamoeba*), such as *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Naegleria fowleri*, or *Entamoeba histolytica* oocysts [30]. Therefore, *Acanthamoeba* is a reliable model to simulate water treatment processes and evaluate the efficiency and usefulness of different disinfectants.

Given these considerations, the main objective of this study was to evaluate the effectiveness of the combination of NaClO (Cl₂) and solar radiation (SR) against *Acanthamoeba* (FLA) and their endosymbiont bacteria (EB). Treatments were developed against two environmental *Acanthamoeba* strains, one isolated from freshwater and one from chlorinated and solar-exposed water. Different chlorine concentrations, exposure times, and UV wavelengths were evaluated. This study represents the first disinfection investigation in which environmental endosymbiont bacteria carried by *Acanthamoeba* were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Strain Isolation and FLA Inoculum

Two different environmental *Acanthamoeba* spp. strains were tested: P31 FLA (GenBank accession No. KY038362), isolated from the recreational water of an outdoor swimming pool in Zaragoza (Spain) [31], and C1-211 FLA, isolated from the freshwater of the Noguera Ribagorçana river in Lérida (Spain). The isolation procedure was performed as previously described [5]. The isolated C1-211 FLA strain was submitted to PCR and further sequencing for genus and genotype identification, following the specific protocol for *Acanthamoeba* identification described by Schroeder et al. [32]. The sequence was further compared with the GenBank database thanks to the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool of the National Center for Biotechnology Information, NCBI) bioinformatic tool. The C1-211 FLA sequence was registered in GenBank under the number OQ927217.

Both isolates grew in axenic conditions in a protease peptone, yeast extract, and glucose (BD Difco laboratories, MI, USA) medium (PPYG) at 30 °C. Before each treatment, FLA were harvested by centrifugation at 6000 × *g* for 10 min from PYPG medium cultures and washed in a saline solution (0.9% NaCl, Panreac Química S.L.U., Barcelona, Spain).

2.2. Disinfection Treatments

Disinfection assays were carried out with 20 mL of the sample in sterile 50 mL quartz beakers with continuous stirring. The initial FLA concentration in the assays was adjusted to 1·10⁴–2·10⁴ cells/mL. Five disinfection treatments were evaluated: chlorine (Cl₂), solar radiation with a wavelength range between 320 and 800 nm (SR_{320–800nm}), solar radiation with a wavelength range between 280 and 800 nm (SR_{280–800nm}), the combination of Cl₂ and SR_{320–800nm} (Cl₂/SR_{320–800nm}), and the combination of Cl₂ and SR_{280–800nm} (Cl₂/SR_{280–800nm}). Cl₂, SR_{320–800nm}, and SR_{280–800nm} treatments were developed as gold standards [33].

Cl₂ disinfection assays were conducted in dark conditions and prepared by diluting a 10% *w/v* sodium hypochlorite solution (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Spain). The assays for SR_{280–800nm}, SR_{320–800nm}, and their combination with Cl₂ (Cl₂/SR_{320–800nm} and Cl₂/SR_{280–800nm}) were carried out in an Atlas Suntest CPS+/XLS+ solar chamber equipped with a xenon lamp. This system allowed the reproduction of natural sunlight conditions in the laboratory, covering wavelengths from 280 to 800 nm. A quartz filter and an additional glass filter Xenochrome 320 (Ametek Instruments S.L., Barcelona, Spain) were used to

eliminate wavelengths below 320 nm in SR_{320–800nm} and Cl₂/SR_{320–800nm} assays. All the SR assays were conducted with a light intensity of 500 W/m², corresponding to 50% of the light intensity of the midday equatorial solar radiation [34]. The temperature was maintained below 30 °C during the experiments to ensure that only solar radiation (and not heating) played a role in the disinfection process.

According to the chlorine resistance of *Acanthamoeba* [16], the studied Cl₂ concentrations ranged between 1 and 500 mg/L of Cl₂. In accordance with WHO guidelines [1], the exposure time was set to 30 min. A control without Cl₂ in darkness was evaluated. Additionally, a control without Cl₂ under SR_{320–800nm} and SR_{280–800nm} was evaluated to assess the effect of SR. Aliquots were sampled at the beginning and during the disinfection assays to assess the survival of FLA and the endosymbiont bacteria (EB), pH (using a pH meter, GLP 21 Crison, Hach Lange Spain, Barcelona, Spain), and Cl₂ concentration. Assays were performed in duplicate.

Cl₂ exposure was quantified by the CT factor [35,36]. The residual concentration of Cl₂ was measured by two methodologies: for Cl₂ concentrations above 5 mg/L, sodium thiosulphate microtitration was applied to the sampled aliquots [37] using sodium thiosulphate (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Spain), and for Cl₂ concentrations below 5 mg/L, the N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) methodology was applied [37] using the free chlorine reagent (Hannah Instruments, Eibar, Spain) and a JenwayTM 6305 UV/visible spectrophotometer (Fisher Scientific S.L., Madrid, Spain).

SR_{280–800nm} and SR_{320–800nm} exposures were quantified by the SR dose or fluence (F), which is directly related to the inactivation of microorganisms. As the light intensity applied was constant over time, the SR dose or fluence can be calculated as a product of the light intensity and the exposure time: $F = \text{light intensity (W/m}^2) \times \text{time (s)}$, in W.s/m² [35].

2.3. Determination of FLA and EB Inactivation

FLA survival was quantified using the most probable number (MPN) procedure. A sodium thiosulfate solution was added to the aliquots for chlorine neutralization. Ten microliters of the sampled aliquots and their dilutions (10^{-1} and 10^{-2}) was inoculated onto Non-Nutrient Agar (NNA, BD Difco laboratories, MI, USA) plates covered by heat-inactivated *Escherichia coli*. Each inoculation was performed in quintuplicate. Additionally, 100 µL of the sampled aliquots was inoculated in quintuplicate on a separate plate. The plates were incubated for 15 days at 30 °C and regularly observed under an optical microscope to determine the presence or absence of growth with a ZEISS-Axiostar plus microscope (Carl Zeiss Ibérica S.L., Madrid, Spain). Results were reported using an MPN table [38]. If no amoebic growth was detected in the 10 µL aliquots, then the 100 µL aliquots were checked for growth; no growth indicated total killing of the amoebae.

The inactivation of FLA was defined as a logarithmic reduction (N/N_0), where N_0 and N were the most probable number of viable cells before and after t time of the treatments, respectively. FLA inactivation was recorded as a function of chlorine concentration (mg/L). The necessary Cl₂ concentration for a 2-log ($[Cl_2]_{99\%}$) and a 3-log ($[Cl_2]_{99.9\%}$) inactivation was calculated from the linear regression section of the FLA inactivation curves. FLA inactivation by only Cl₂ was also recorded as a function of CT (mg.min/L) in Cl₂ assays. The necessary CT for a 2-log ($CT_{99\%}$) and a 3-log ($CT_{99.9\%}$) inactivation was calculated from the linear regression section. In the case of SR_{280–800nm} and Cl₂/SR_{280–800nm} assays, FLA inactivation was also recorded as a function of time (min) and fluence (KW.s/m²). The necessary SR_{280–800nm} fluence for a 2-log ($F_{99\%}$) and a 3-log ($F_{99.9\%}$) inactivation was calculated from the linear regression section of the FLA inactivation curves. FLA inactivation curves were obtained by Microsoft Excel 365 Software.

EB survival was determined semi-quantitatively. A sodium thiosulfate solution was added to the aliquots for chlorine neutralization. In total, 10 µL and 100 µL of the sampled aliquots throughout the experiments were inoculated onto Müeller Hinton agar plates (BD Difco laboratories, MI, USA). Each inoculation was performed in quintuplicate for the disinfection assays. The plates were incubated for 48 h at 37 °C and observed every 24 h

to determine the presence or absence of growth. EB survival was categorized into three groups: non-affected survival if bacteria growth was similar to control; affected survival if a reduction in bacteria growth was observed compared to control; and the inactivation of bacteria if no bacteria growth was detected after the treatment.

3. Results

3.1. Inactivation of *Acanthamoeba* by Conventional Treatments

To determine the disinfection effectiveness of Cl_2 , FLA and EB inactivations were evaluated after 30 min of exposure to Cl_2 concentrations that varied from 1 to 500 mg/L (Figure 1a). Exposure to Cl_2 yielded a gradual *Acanthamoeba* C1-211 reduction to its total inactivation after exposures of 100 mg/L. In the case of *Acanthamoeba* P31, 250 mg/L of Cl_2 was necessary to achieve a 3-log reduction ($[\text{Cl}_2]_{99.9\%}$ in Table 1) and inactivate FLA. FLA inactivation by Cl_2 was also recorded as a function of CT (Figure 1b) to calculate the necessary CT values for a 2-log and a 3-log FLA inactivation (Table 1).

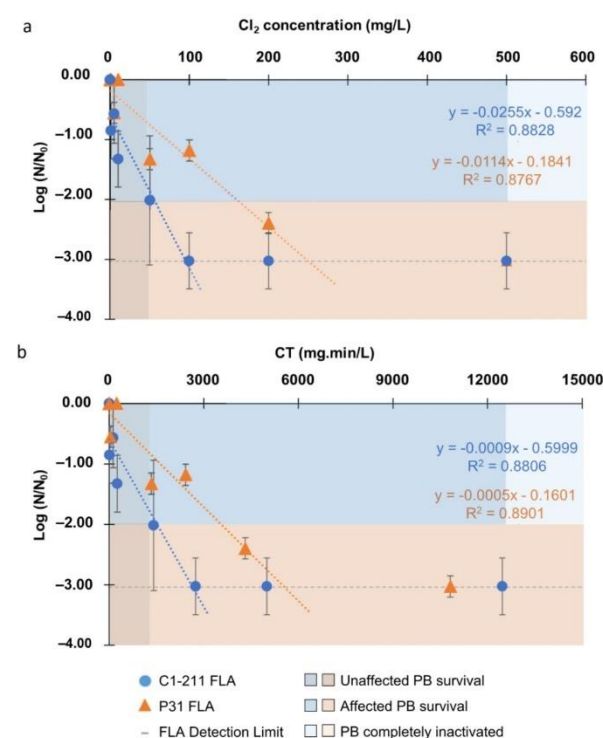
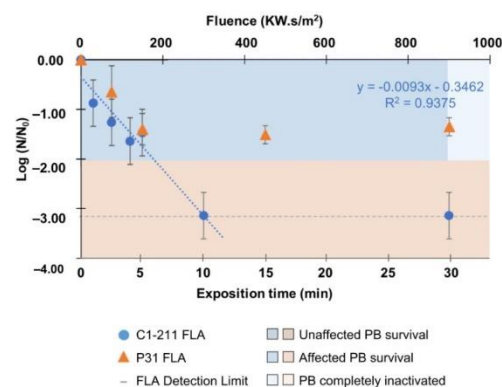


Figure 1. FLA and EB inactivation after 30 min of Cl_2 disinfection treatment at different (a) Cl_2 concentrations and (b) CT values. The darkest blue (C1-211) and orange (P31) background colors indicate that EB survival was not affected; intermediate shades of blue and orange colors indicate that EB survival was affected; and the lightest shades of blue and orange colors indicate that EB was totally inactivated.

Table 1. Required Cl_2 doses (mg/L), CT (mg.min/L), and F (KW.s/m^2) for achieving a 2-log (99%) and a 3-log (99.9%) inactivation of *Acanthamoeba* and EB.

Treatment	C1-211			P31		
	$[\text{Cl}_2]_{99\%}$	$[\text{Cl}_2]_{99.9\%}$	$[\text{Cl}_2]_{\text{EB}}$	$[\text{Cl}_2]_{99\%}$	$[\text{Cl}_2]_{99.9\%}$	$[\text{Cl}_2]_{\text{EB}}$
Cl_2	55	94	500	159	247	>500
$\text{Cl}_2/\text{SR}_{320-800\text{nm}}$	4	8	50	178	319	500
$\text{Cl}_2/\text{SR}_{280-800\text{nm}}$	-	-	5	1	4	100
Treatment	CT _{99%}	CT _{99.9%}	CT _{EB}	CT _{99%}	CT _{99.9%}	CT _{EB}
Cl_2	1556	2667	12,471	3680	5680	>10,820
Treatment	F _{99%}	F _{99.9%}	F _{EB}	F _{99%}	F _{99.9%}	F _{EB}
$\text{SR}_{320-800\text{nm}}$	>900	>900	>900	>900	>900	>900
$\text{SR}_{280-800\text{nm}}$	178	285	900	-	-	>900

To determine the disinfection effectiveness of SR, FLA and EB inactivations were assessed throughout the 30 min of SR exposure. Two wavelength ranges were compared: 280–800 nm (which included UV-A and UV-B radiation, Figure 2) and 320–800 nm (which included UV-A). Results showed that $\text{SR}_{320-800\text{nm}}$ alone did not result in FLA reduction after 30 min of exposure. In contrast, 10 min (fluence of 300 KW.s/m^2) of $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ alone completely inactivated C1-211 FLA. The necessary fluence for a 2-log and a 3-log C1-211 FLA inactivation was calculated from the linear section of the inactivation curve (Table 1). For P31 FLA, $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ alone caused a gradual 1.5-log reduction during the first 5 min, but FLA survival was sustained throughout the remainder of the experiment; hence, the necessary fluence for a 2-log or a 3-log reduction in P31 FLA remains unknown.

**Figure 2.** FLA and EB inactivation during 30 min of $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ disinfection treatment. The darkest blue (C1-211) and orange (P31) background colors indicate that EB survival was not affected; intermediate shades of blue and orange colors indicate that EB survival was affected; and the lightest shades of blue and orange colors indicate that EB was totally inactivated.

3.2. Inactivation of *Acanthamoeba* by Chlorine Photolysis

To assess the effectiveness of the combination of Cl_2 and SR against FLA and EB, the same wavelength ranges (280–800 nm and 320–800 nm) and Cl_2 concentrations (ranging from 1 to 500 mg/L) were compared after 30 min of treatment (Figure 3a,b). The combination of Cl_2 and simulated SR enhanced the reduction in C1-211 FLA using both wavelength ranges, while only the combination of Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ enhanced P31 FLA inactivation. The combination of 5 mg/L of Cl_2 with both SR wavelength ranges resulted in a 3-log

reduction in C1-211 FLA (Figure 4a,b), reducing the necessary inactivating Cl_2 concentration by 20 times. In the case of P31, the FLA reduction obtained by the combination of Cl_2 and $\text{SR}_{320-800\text{nm}}$ was similar to that obtained by exposure to only Cl_2 : approximately 300 mg/L for 30 min was necessary for a 3-log FLA reduction (Table 1). On the contrary, the combination of 5 mg/L of Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ totally inactivated P31 FLA, reducing the required amount of Cl_2 by 50 times.

FLA inactivation was also assessed at different times during the disinfection assays combining Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$. When combining 1 or 5 mg/L of Cl_2 with simulated $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$, C1-211 FLA reduction was not improved compared to $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ alone (Figure 4a). However, the combination of 50 mg/L of Cl_2 and simulated $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ accelerated the C1-211 FLA reduction compared to $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ alone, yielding a 3-log reduction after 5 min of exposure instead of 10 min. In the case of P31 FLA (Figure 4b), the combination of Cl_2 and simulated $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ improved P31 FLA reduction compared to Cl_2 or $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ alone: a 2-log, 3-log, and 4-log P31 FLA reduction was achieved combining $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ exposure with 1, 5, and 50 mg/L of Cl_2 , respectively. Taking the results of both FLA strains together, the combination of 5 mg/L of Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ for 10 min achieved a 3-log FLA inactivation for both *Acanthamoeba* strains studied, drastically reducing the necessary Cl_2 concentration for their inactivation by 20–50 times.

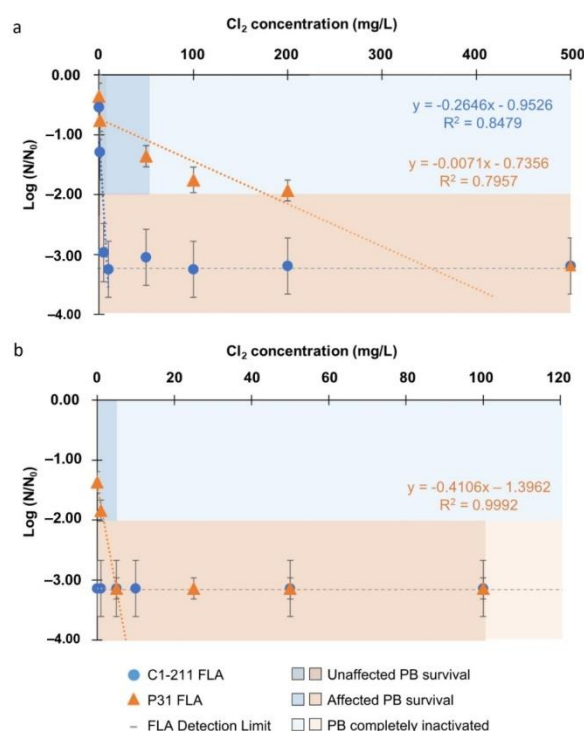


Figure 3. FLA and EB inactivation after 30 min of (a) the combination of Cl_2 and $\text{SR}_{320-800\text{nm}}$ and (b) the combination of Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ at different Cl_2 concentrations. The darkest blue (C1-211) and orange (P31) background colors indicate that EB survival was not affected; intermediate shades of blue and orange colors indicate that EB survival was affected; and the lightest shades of blue and orange colors indicate that EB was totally inactivated.

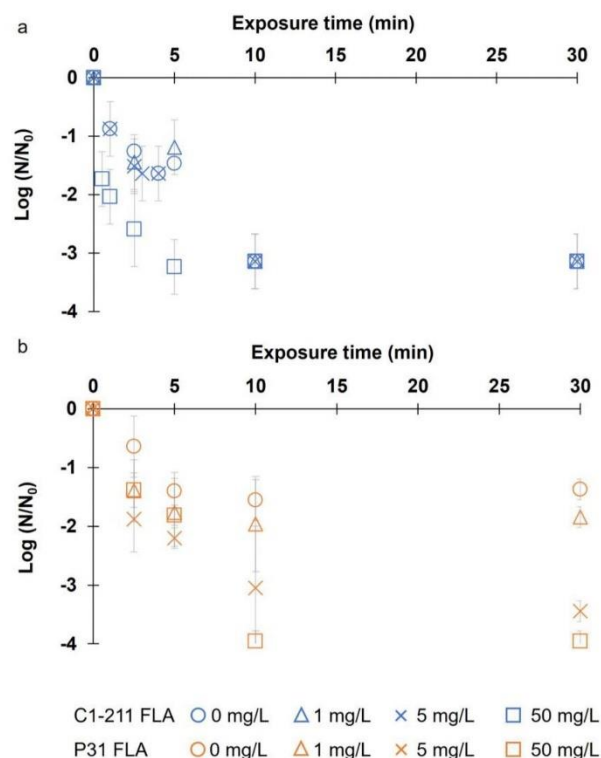


Figure 4. Inactivation of (a) C1-211 FLA and (b) P31 FLA along 30 min of combining Cl₂ and SR_{280–800nm} with different Cl₂ concentrations.

3.3. Endosymbiont Bacteria Inactivation

To assess the disinfection efficiency of the treatments on the environmental endosymbiont bacteria protected by the studied FLA, EB survival was measured semi-quantitatively by determining the presence or absence of growth after the treatments. The survival of EB was categorized as non-affected survival, affected survival, or inactivation, as indicated by the colors in Figures 1–3. To compare the effectiveness of treatments, the necessary [Cl₂], CT, and F for BRA inactivation were described based on the conditions that resulted in a total absence of EB growth under the studied conditions (Table 1).

Cl₂ affected EB survival if the concentration was equal to or higher than 50 mg/L for both FLA (Figure 1a); EB survival remained unaffected at lower Cl₂ concentrations. To achieve complete bacterial growth inactivation, exposures of 500 mg/L for 30 min were necessary for C1-211, while higher Cl₂ doses might be necessary for the total inactivation of P31 EB. The CT value necessary for inactivating C1-211 EB is 12,471 mg·min/L (Table 1), four times higher than the CT value necessary for C1-211 FLA inactivation (CT_{99.9%}). In the case of P31, the CT value necessary for P31 EB inactivation might be higher than 10,820 mg·min/L.

Similar to FLA, EB survival was unaffected after exposure to SR_{320–800nm} alone, even at the highest SR exposures used (900 KW·s/m²). However, SR_{280–800nm} irradiation did affect EB. In the case of C1-211, SR_{280–800nm} achieved the absence of EB growth after 30 min

of exposure (900 KW.s/m², three times higher fluence than C1-211 FLA). For P31, 30 min of exposure was not enough to achieve the total inactivation of bacterial growth (Figure 2).

The combination of Cl₂ and simulated SR dramatically reduced the required concentration of Cl₂ for inactivating C1-211 EB growth: from 500 mg/L of Cl₂ (Figure 1) to 50 mg/L if combining Cl₂ and simulated SR_{320–800nm} (Figure 3a) and to 5 mg/L when combining it with SR_{280–800nm} (Figure 3b). In the case of P31, doses of 500 mg/L might be necessary for inactivating EB growth when combining Cl₂ and simulated SR_{320–800nm} (Figure 3a), whereas combining Cl₂ and simulated SR_{280–800nm} (Figure 3b) required 100 mg/L of Cl₂ for inactivating P31 EB, reducing the necessary Cl₂ for P31 EB inactivation more than five times.

4. Discussion

4.1. *Acanthamoeba* Inactivation by Conventional Treatments: Chlorine and Solar Radiation

Chlorine is a widely used disinfectant, especially in drinking water processes, due to its efficiency against bacteria. However, higher doses than those typically used (1–5 mg/L) in freshwater or swimming pool water treatments are necessary to inactivate protozoans [2,35] such as *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., or Free-Living Amoebae (FLA). Moreover, effective doses vary among genera; for instance, 1–7 mg/L of free chlorine during 5–30 min was cysticidal against *Naegleria* spp., while 10 mg/L of free and combined chlorine for 30 min was effective against *Vermamoeba vermiformis* [16]. *Acanthamoeba*, as revealed in the present study, was reported to be especially resistant to high chlorine doses [18].

The obtained results showed that the *Acanthamoeba* isolates studied were highly resistant to Cl₂, needing treatments of 100 mg/L and 250 mg/L for 30 min to achieve the total inactivation of C1-211 and P31, respectively (Figure 1a and Table 1). These doses are 100 times higher than those typically used for drinking water processes, explaining the presence of FLA in drinking water networks, recreational water [12], ornamental fountains [14], or even hospital water [13]. These findings align with Storey et al. [39], who reported that 100 mg/L of chlorine for 10 min was ineffective for inactivating *Acanthamoeba*. Nevertheless, the isolates studied here were more sensitive than others studied previously, such as *Acanthamoeba* spp. studied by Gabriel and Panaligan [18] that suffered less than a 2-log reduction after Cl₂ doses of 500 mg/L or some of the isolates evaluated by Coulon et al. [40] that survived after 2500 mg/L for 30 min. It should be noted that such resistances belong to cysts, which can be between 6 and 30 times more resistant to chlorine doses than trophozoites [41], while in this study, FLA inoculums contained both cysts and trophozoites.

The efficacy of chlorine as a disinfectant can be predicted by the CT value [42]. The results for both *Acanthamoeba* isolates studied (Table 1) are consistent with findings by Loret and Greub [15], who compiled FLA inactivation data from different studies and estimated that the CT_{99%} for *Acanthamoeba* cysts was between 1200 and 6500 mg.min/L of Cl₂. When compared with Dupuy et al. [41], both amoebae studied here exhibited greater resistance to chlorine, achieving a CT_{99%} of 865 mg.min/L for *Acanthamoeba* cysts.

Due to the generation of trihalomethanes and other potentially carcinogenic chlorine byproducts [43], the Cl₂ doses demonstrated as effective in this study are too high for practical use in real installations. Therefore, alternatives are necessary.

Solar radiation is used as a disinfectant due to the germicidal power of ultraviolet (UV) radiation (and thermal heating). This germicidal efficiency is highly dependent on the wavelength, with the UVC range (200–280 nm) being the most effective, followed by the UVB (280–320 nm) and UVA (320–400 nm). However, solar disinfection activity is limited to wavelengths between 290 and 400 nm, as the Earth's atmosphere naturally absorbs UVC and part of UVB radiation [2]. In this study, the disinfectant power of two solar radiation wavelength ranges was evaluated: SR_{280–800nm} (part of UVB, UVA, and visible radiation) and SR_{320–800nm} (UVA and visible radiation). These ranges represent direct exposure to SR and the exposure to SR through a glass or plastic reactor (as in SODIS processes), respectively. On the one hand, the UVB range directly acts on the

DNA of cells, inducing the formation of thymine dimers [44] that can inhibit the normal replication and transcription of DNA [17]. UVB can also damage microorganisms through photosensitization mechanisms that produce reactive oxygen species (ROS), affecting different cellular components, including DNA, indirectly. On the other hand, UVA can only indirectly damage DNA through ROS action; it can also increase the permeability of the cell [45] and affect vital compounds for cell metabolism and homeostasis [44].

Results revealed that SR_{320–800nm} (fluences of 900 KW.s/m²) was completely ineffective, while SR_{280–800nm} totally inactivated C1-211 FLA after a fluence of 300 KW.s/m² and partially inactivated (1.5-log reduction) P31 FLA after 150 KW.s/m², maintaining this inactivation rate even after exposure to a fluence of 900 KW.s/m² (Figure 2). These results point out that the UVB range (280–320 nm) could cause a reduction in FLA, but only the UVA-induced oxygen reactive species were not effective enough to inactivate these FLA, though UVA could have a synergistic effect with UVB radiation effects during SR_{280–800nm} assays. The 1.5-log P31 FLA reduction achieved and maintained after 5 min of SR_{280–800nm} treatment might correspond with trophozoite inactivation. P31 cysts might remain viable after this exposure, agreeing with Lonnen et al. [19], who reported that solar disinfection (870 W/m² in the 300 nm–10 µm wavelength range) reduced the viability of *A. polyphaga* trophozoites but was ineffective against cysts.

It is difficult to compare these results with previous studies, as long as different UV radiation wavelengths and light intensities have been studied. Still, the results of SR_{320–800nm} might align with those of Adan et al. [45], who reported less than a 1-log reduction in the trophozoites of an *Acanthamoeba* strain after 125 min of UVA irradiation. F_{99%} and F_{99.9%} values might help to compare with other studies, though differences in treatment conditions and whether cysts or trophozoites are studied should be noted (Table 1). In this context, C1-211 and P31 FLA appear to be more sensitive to SR_{280–800nm} than the *Acanthamoeba* strains studied by Heaselgrave and Kilvington [46] and Lonnen et al. [19]. Heaselgrave and Kilvington [46] irradiated *A. castellanii* cysts with 550 W/m² of SR_{290–800nm} and achieved a 2-log reduction after 2 h of treatment (F_{99%} = 3960 KW.s/m²). Lonnen et al. [19] found that *A. polyphaga* trophozoites suffered a 2-log reduction after 2 h of 870 W/m² of SR_{300nm–10µm} disinfection treatment (F_{99%} = 6264 KW.s/m²), while cysts were barely reduced (less than 1-log reduction) after 8 h of solar disinfection (fluence of 28,800 KW.s/m²).

Solar radiation, though considered an interesting alternative to chlorine for water disinfection as it avoids the formation of organochlorides [43], did not achieve the complete inactivation of the P31 *Acanthamoeba* strain studied, underlying the necessity of alternative disinfection processes.

4.2. *Acanthamoeba* Inactivation by Advanced Oxidation Process: Combination of Cl₂ and SR

Powerful oxidizing agents are generated during Advanced Oxidation Processes (AOPs). These highly reactive species have a biocide effect since they act non-selectively on biomolecules, compromising the survival of microorganisms [26]. Oxidant species such as ozone and hydroxyl radicals (•OH) can be generated in situ through Cl₂ photolysis at the UV wavelengths characteristic of natural sunlight [24]. Additionally, reactive chlorine species (RCS) such as Cl•, Cl₂•[−], and ClO• are formed during this process and may also contribute to microbial inactivation [29]. Indeed, sunlight-driven chlorine photolysis has already been demonstrated to dramatically accelerate the inactivation of highly chlorine-resistant microorganisms such as *Bacillus subtilis* endospores [27] and *Cryptosporidium parvum* [24]. Thus, the inactivation efficiency of the combination of Cl₂ and SR at two different wavelength ranges was evaluated.

Results of the combination of Cl₂ and SR assays (Figures 3 and 4) showed that *Acanthamoeba* reduction could be much more efficient than Cl₂ or SR treatments alone, especially when the SR_{280–800nm} wavelength range was used. The combination of 5 mg/L of Cl₂ and SR_{280–800nm} for 10 min achieved a 3-log reduction in both C1-211 and P31 FLA, reducing the necessary Cl₂ for their inactivation between 20 and 50 times. This presents an interest-

ing and attractive disinfection treatment for eliminating amoebae from water. Although SR_{280–800nm} and 5 mg/L of Cl₂/SR_{280–800nm} treatment were equally efficient against C1-211 FLA, maintaining a residual disinfection effect after the treatment, as in the case of Cl₂/SR_{280–800nm}, may produce beneficial results [26]. These results agree with Wang et al. (2023), who obtained similar efficiencies when testing the combination of 5 mg/L of Cl₂ and solar radiation against *Dictyostelium discoideum* amoebae: a 3-log reduction after 10 min of exposure that increased to a 5-log reduction when the exposure time increased to 20 min.

In comparison, the combination of Cl₂ and SR_{320–800nm} was effective in removing C1-211 FLA, but it was counterproductive against P31 FLA. Taking into account that chlorine photolysis combines multiple mechanisms to inactivate pathogens, (1) a direct reaction with HOCl/OCl[−], (2) direct photolysis by UV irradiation, and (3) oxidizing molecule attacks (ROS, RCS, and O₃) [25], variations between combining Cl₂ with SR_{280–800nm} and SR_{320–800nm} might be related to different disinfection mechanisms implied. The direct photolysis of chlorine and the subsequent formation of reactive oxidant species are dependent on pH and wavelength. Considering the pH of the assay solutions (Table 2) and the HOCl acid dissociation constant (pK_a = 7.5), OCl[−] might be the predominant chlorine species present in most of the assays combining Cl₂ and SR. The two shifting chlorine species (HOCl/OCl[−]) have different UV–visible absorption spectra: OCl[−] has its maximum absorption coefficient at 292 nm. Hence, the irradiation of OCl[−] at 280–800 nm (during the assays that combine Cl₂ and SR_{280–800nm}) might mainly produce [•]OH thanks to successive reactions (1–6). At wavelengths higher than 320 nm, as those irradiated during the assays that combine Cl₂ and SR_{320–800nm} and after successive reactions (7–8), ozone is principally produced [25,27]. Looking at the results, [•]OH radicals seem to be a more efficient inactivation route than ozone for C1-211 and P31 FLA inactivation.

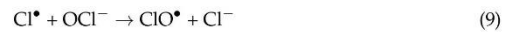
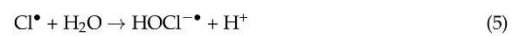


Table 2. pH of Cl₂, Cl₂/SR_{280–800nm}, and Cl₂/SR_{320–800nm} assays at different times.

Initial Concentration (mg Cl ₂ /L)	Cl ₂		Cl ₂ /SR _{280–800nm}			Cl ₂ /SR _{320–800nm}	
	0 min	30 min	0 min	5 min	10 min	0 min	30 min
0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.1	7.0	7.4
1	7.0	7.1	nd	nd	nd	7.1	7.4
5	8.4	8.2	8.4	8.6	9.5	8.6	7.4
10	8.6	7.6	nd	nd	nd	8.7	8.2
50	9.9	9.0	9.9	10.0	10.3	9.9	9.0
100	10.3	9.6	nd	nd	nd	10.3	9.8

Note: nd—not determined.

RCS formed during Cl₂/SR_{280–800nm} and Cl₂/SR_{320–800nm} treatments (reactions 1, 2, 9, 10) might also contribute to microbial inactivation, though it is not clear to what extent

as long as Cl^\bullet reacts more selectively than $\bullet\text{OH}$. In addition, if Cl^\bullet production varies according to the irradiated wavelength, this has not been comprehensively studied yet [25]. Hence, the potential microbial inactivation role of RCS in the studied treatments remains unknown. Since this was not the main objective of the present work, further fundamental experimentation would be necessary to better understand RCS disinfection power during chlorine photolysis.

Forsyth et al. [27] suggested activating chlorine with UVA light as an attractive strategy to enhance the inactivation of chlorine-resistant pathogens. However, lower wavelengths (as those used during the combination of Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$) seem necessary for the effective inactivation of *Acanthamoeba*, even in the presence of Cl_2 . In this sense, Chauque and Rott [28] evaluated the disinfection capacity of $\text{Cl}_2/\text{UV}_{254\text{nm}}$ against an *A. castellanii* strain. They found that low Cl_2 concentrations (1–8 mg/L) during long $\text{UV}_{254\text{nm}}$ (2.43 W/m^2) exposure times (two rounds of 90 min) were effective in inactivating both trophozoites and cysts. Although low Cl_2 doses were used to reduce the cost of water treatment, high energy input was necessary to cover those exposure times. Depending on water use and point-of-use requirements, such long times could not be feasible. Also, whether bacteria protected inside the amoeba could be able to survive after that treatment was not studied and remains unknown.

4.3. Inactivation of the Endosymbiont Bacteria Protected Inside *Acanthamoeba*

Free-Living Amoebae were reported to be protectors of a wide variety of microorganisms (viruses, bacteria, and fungi), making it possible to protect potentially pathogenic bacteria such as *Mycobacterium* spp., *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* spp., *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, or the most known and studied, *Legionella pneumophila* [6,7]. Amoebae undergo a dormant stage called the cyst when environmental conditions are not comfortable for their active form. This encystation process involves the production of a robust, thick wall that confers huge resistance to the amoebae against disinfectants. The cystic wall of *Acanthamoeba* is a double-layered wall composed of the ectocyst, which is mostly composed of proteins and polysaccharides, and the endocyst, mostly composed of cellulose. Higher cellulose content is associated with increased resistance to biocides [8]. While much is still to be learned about amoebic cysts, it is known that their composition varies among strains, leading to variations in resistance against disinfection treatments [40].

Although several studies have reported that the cystic stage is very resistant to harsh conditions and disinfectants [16], few have explored their capacity to protect the microorganisms inside during these treatments. Some studies have shown that bacteria are more resistant to disinfection treatments in the presence of amoebae than in their absence. Nevertheless, these findings were often attributed to phenotypical bacterial changes [22,47] or the scattering of UV light by amoebae [45], rather than to amoeba protection. Few studies evaluated the inactivation capacity of disinfectants against bacteria protected by amoeba, and in any case, amoebae were in vitro-infected, and conventional disinfectants such as chlorine [20], monochloramine, chlorine dioxide [47], or $\text{UV}_{254\text{nm}}$ [22] were evaluated. Only Wang et al. [29] evaluated the inactivation capacity of chlorine photolysis against bacteria in vitro-internalized inside amoebae. Nevertheless, this study represents the first instance of evaluating the environmental endosymbiont bacteria protected and carried by amoebae among disinfection studies.

As a general trend, results showed that exposure doses that compromised FLA survival were insufficient for EB inactivation. EB survived even when FLA were inactivated (Table 1), proving that amoebae confer great protection to microorganisms within them, agreeing with reports by He et al. [22].

In the case of Cl_2 treatments (Figure 1a), EB might remain unaffected while both trophozoites and cysts remain barely unaffected (at Cl_2 concentrations lower than 50 mg/L). Bacteria inside trophozoites might start to be affected when Cl_2 concentrations are high enough to penetrate trophozoites, but cyst structures might remain intact even when inactivated [22], protecting bacteria inside at Cl_2 concentrations several times higher (Table 1).

Cl₂ doses above 500 mg/L (CT above 12,000 mg.min/L) were necessary to totally inactivate C1-211 EB, while bacteria protected by P31 FLA require higher Cl₂ doses. These results disagree with Wang et al. [29], who reported similar inactivation levels of *Dictyostelium discoideum* amoeba and *Burkholderia agricolaris* bacteria protected inside; however, this might be due to the high chlorine sensitivity of the amoeba (CT_{99.9%} of 40 mg.min/L) or to a different relationship between *D. discoideum* and its associated bacteria [48] compared to *Acanthamoeba* [6]. Otherwise, these results agree with García et al. [21], who reported that *L. pneumophila* could resist 1024 mg/L of NaOCl when protected by *A. polyphaga* ATCC 50998. It should be considered that the basic pH due to such high chlorine concentrations (Table 2) could also affect FLA survival, though according to Khan [49], *Acanthamoeba* can grow at pH ranging from 4 to 12.

Like FLA, SR_{320–800nm} alone was unable to affect EB survival. This agrees with reports by Adan et al. [45], who found that *Escherichia coli* was barely unaffected after 150 min of UVA exposure if *Acanthamoeba* was also present. Conversely, SR_{280–800nm} inactivated C1-211 EB growth after 30 min of exposure (900 KW.s/m²), a three times higher dose than the one necessary for C1-211 FLA inactivation (Figure 2). He et al. [22] also reported that FLA were able to protect EB inside even after being inactivated by UV_{254nm}. He et al. [22] observed that cysts were not broken or damaged after UV_{254nm} radiation, suggesting that cysts can absorb and screen UV light, letting only a fraction of UV light reach the internalized bacteria. In the case of P31, SR_{280–800nm} affected the bacteria protected, but some EB still survived after 900 KW.s/m², not achieving total bacteria inactivation. This might be related to the fact that such fluence was not enough to inactivate the amoebae that protected them either.

The combination of Cl₂ and SR, as conventional disinfection treatments, required higher doses for EB than for FLA inactivation, reinforcing the bacteria-protecting role of amoebae. The combination of Cl₂ and SR_{320–800nm} required 10 times higher Cl₂ doses to inactivate C1-211 EB compared to FLA (50 vs. 5 mg/L, respectively). This disinfection treatment was not effective against P31 EB as long as it was not effective against P31 FLA either. In the case of combining Cl₂ and SR_{280–800nm}, 5 mg/L of Cl₂ was also efficient to inactivate C1-211 EB, but it was necessary to increase the exposure time from 10 min (necessary for inactivating C1-211 FLA) to 30 min, while increasing the Cl₂ dose 20 times was required to inactivate P31 EB (from 5 to 100 mg/L, compared with P31 FLA). This might be due to the cyst wall, which might act as a highly resistant shell, providing a protective environment inside, whether the cyst is active or inactive. The cyst wall resistance is directly related to its composition and the thickness of the layers, issues that might vary depending on the FLA strains but also on the culture and environmental conditions [8], potentially explaining differences in resistance to disinfection treatments between C1-211 and P31.

Comparing with treatments alone, the combination of Cl₂ and SR and the oxidizing species (ROS, RCS, and O₃) generated resulted in more efficient disinfection treatments, particularly Cl₂/SR_{280–800nm}, reducing several times the disinfectant doses necessary for EB inactivation. The combination of Cl₂ and SR_{320–800nm} required 10 times lower Cl₂ doses to inactivate C1-211 EB compared to Cl₂ treatment (from 500 to 50 mg/L). This treatment, equivalent to adding chlorine to a solar disinfection (SODIS) process, though effective against C1-211 EB, did not achieve EB inactivation for P31 under the conditions studied, which is in accordance with FLA results. In the case of combining Cl₂ and SR_{280–800nm}, as applied to FLA, it proved to be a more efficient process than Cl₂ or SR alone against EB. Cl₂/SR_{280–800nm} achieved the total inactivation of EB, reducing between 5 and 10 times the necessary Cl₂ dose. The enhancement in disinfectant efficiency through chlorine photolysis was also reported by Chauque and Rott [28] inactivating *Acanthamoeba castellanii*, Wang et al. [29] inactivating *D. discoideum* and *B. agricolaris*, and Zhou et al. [24] inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts, among others. Thus, results pose chlorine photolysis as an attractive disinfection process for further research. Cl₂ doses and exposure time optimizations could drive ready-to-use disinfection treatments tailored to specific water uses.

The generation of byproducts, such as trihalomethanes or haloacetic acids, from dissolved organic matter (DOM) during chlorination and chlorine photolysis has been frequently studied. While it is true that chlorine photolysis can reduce byproduct generation compared to chlorination processes by reducing DOM concentration, chlorine doses, and exposure time [25], further studies will be necessary to implement this treatment and prevent undesirable organic byproducts' formation.

Acanthamoeba can host a wide variety of bacteria within them [6]. Some of the endosymbiont bacteria carried by *Acanthamoeba* either do not grow under the conditions used in this study or are even non-culturable, requiring the use of reference bacteria to facilitate the visualization of the disinfection results. In this case, bacteria capable of growing rapidly in a nutrient medium and under an aerobic atmosphere were selected as references. Nevertheless, this study underlines the significant role amoebae can play in protecting and transporting potential pathogens throughout the water network.

4.4. Effect of Water Sources: *Acanthamoeba* Isolated from Natural vs. Artificial Water Sources

Differences in disinfection resistance were observed among the studied amoebae. Several studies have previously documented variations in resistance to disinfectants between different amoeba genera and strains. These differences are usually related to different cystic wall compositions [41]. Water sources from which amoebae are isolated might also influence disinfectant resistance, given that amoebae are adapted to different environmental conditions. As P31 has already overcome several disinfection treatments and inhabits an artificial water system such as an outdoor swimming pool, where it is constantly exposed to solar radiation and chlorine presence, it can be expected to be more resistant to all the treatments evaluated. Indeed, it agrees with Coulon et al. [40], who also reported higher resistance to disinfectants in the case of *Acanthamoeba* strains isolated from hospital water compared to *Acanthamoeba* strains isolated from river water.

The higher resistance to Cl_2 could be attributed to the constant presence of chlorine in the swimming pool where P31 FLA was isolated. Regarding solar radiation, since both amoebae were isolated from outdoor water environments reached by solar radiation, the differences found are likely to be due to the lower turbidity of the outdoor swimming pool where P31 FLA inhabited compared to the river where C1-211 FLA inhabited. In freshwater, numerous particles and microorganism aggregates can cause turbidity and scatter UV light [35] and thus, C1-211 FLA might be less accustomed to direct solar radiation. Given that P31 FLA was more resistant to Cl_2 and SR treatments, it was also expected to be more resistant to their combination. What raises significant concern is that the more resistant the *Acanthamoeba* strain was, the higher the disinfectant doses were required to inactivate their EB.

Based on the differences found, water disinfection protocols should be tailored to the source and intended use of the water. Freshwater or reclaimed water might contain amoebae similar to C1-211, and depending on its further use, a treatment capable of inactivating environmental FLA from freshwater and their protected bacteria should be used as a preventive measure (according to results, disinfecting with 5 mg/L of $\text{Cl}_2/\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ for 30 min). In contrast, for water uses where the need for complete disinfection becomes imperative, such as hospitals or refrigeration towers, a more aggressive treatment would become necessary for inactivating FLA that are adapted to artificial water systems and their intracellular bacteria, such as *Acanthamoeba* P31 (according to results, 100 mg/L of $\text{Cl}_2/\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ for 30 min). As these conditions are too demanding, further studies with longer exposure times and lower chlorine concentrations, as Chauque and Rott [28] recommended, are necessary.

This study, by comparing amoebae strains isolated from different water sources, provides insight into the importance of preventive measures for ensuring water quality. Environmental amoebae from freshwater, such as C1-211 FLA, can be very resistant to conventional treatments and easily reach artificial water systems. There, the endosymbiont bacteria carried by amoebae can be released and colonize the water system, posing a

health threat to exposed individuals. If additional FLA-ineffective treatments are included downstream, such as chlorination at swimming pools, the most resistant strains will be selected and will colonize the water system (as P31 FLA), making future efficient disinfection extremely difficult and leading to possible recurrent outbreaks of, e.g., *Legionella pneumophila* [13] or antibiotic-resistant bacteria [23]. If FLA-efficient disinfection treatments were established at water treatment plants, FLA populations in human-made water systems could be reduced. As it can be too expensive and difficult to include such treatments for large amounts of water, more aggressive treatments for lower flows would be convenient at specific points of water use where more sensitive people can be exposed, such as hospitals or swimming pools for children and elderly people.

In this context, $\text{Cl}_2/\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ emerges as an interesting point-of-use treatment widely applicable since both chlorine and solar radiation are the most extended disinfection treatments worldwide, especially in developing areas [27], and would improve protection against other pathogens too [30]. Nevertheless, dissolved organic matter (DOM) should be considered as it may promote the formation of harmful byproducts when reacting with chlorine, determining the viability of the process. In this regard, the treatment may be more suitable for low-DOM waters [24,27], and further studies should be developed considering this issue.

As chlorine is the baseline disinfectant due to its high efficiency in pathogen removal cost-effectiveness, the results and methodology presented herein can serve as a valuable reference for further research aimed at optimizing the present conditions for a ready-to-use point-of-use treatment.

5. Conclusions

- Conventional chlorine and solar radiation disinfection treatments required high disinfectant doses and were not effective against the endosymbiont bacteria protected by the amoebae studied.
- The combination of Cl_2 and $\text{SR}_{320-800\text{nm}}$ was effective against the freshwater *Acanthamoeba* strain and its endosymbiont bacteria, reducing 10 times the required Cl_2 dose. Additionally, the Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ combination was effective against both *Acanthamoeba* and their endosymbiont bacteria, reducing between 5 and 100 times the necessary Cl_2 dose.
- The inactivation of EB requires the prior inactivation of *Acanthamoeba* cysts, and because of that, the disinfectant doses for efficient disinfection were up to 20 times greater than those used for cyst inactivation.
- The *Acanthamoeba* strain isolated from pool water (P31) and, consequently, the EB protected inside showed considerable higher resistance to the combination of Cl_2 and $\text{SR}_{280-800\text{nm}}$ compared to the *Acanthamoeba* strain isolated from freshwater (C1-211), suggesting that higher disinfectant doses may be required to eliminate amoebae previously exposed to chlorine and solar radiation.

Author Contributions: Conceptualization, C.M. and M.P.O.; Data curation, C.M. and M.S.; Formal analysis, C.M. and M.S.; Funding acquisition, C.M., M.P.O. and P.G.; Investigation, C.M., M.S. and P.C.; Methodology, C.M. and M.P.O.; Project administration, M.P.O. and P.G.; Resources, P.C., M.P.O. and P.G.; Supervision, M.P.O. and P.G.; Validation, C.M. and M.P.O.; Visualization, C.M. and M.S.; Writing—original draft, C.M. and M.S.; Writing—review and editing, C.M., M.P.O. and P.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Government of Aragón, Spain (Research Reference Team Water and Environmental Health B43_23R); Project TED2021-129267B-I00 / AEI/10.13039/501100011033 Next Generation EU / PRTR, OutMicroPress; Project MCIN / AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE (PID2022-14102NB-I00). The authors also thank the regional Government of Aragón for a PhD grant awarded to Carmen Menacho Miralles.

Data Availability Statement: The data that support the findings of the study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- World Health Organization. *Guidelines for Drinking-Water Quality, Fourth ed.: Incorporating the First and Second Addenda*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022; ISBN 978-92-4-004506-4. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064> (accessed on 28 December 2023).
- Pichel, N.; Vivar, M.; Fuentes, M. The problem of drinking water access: A review of disinfection technologies with an emphasis of disinfection technologies with an emphasis on solar treatment methods. *Chemosphere* **2019**, *218*, 1014–1030. [\[CrossRef\]](#)
- Benito, M.; Menacho, C.; Chueca, P.; Ormad, M.P.; Goñi, P. Seeking the reuse of effluents and sludge from conventional wastewater treatment plants: Analysis of the presence of intestinal protozoa and nematode eggs. *J. Environ. Manag.* **2020**, *261*, 110268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Visvesvara, G.S.; Moura, H.; Schuster, F.L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2007**, *50*, 1–26. [\[CrossRef\]](#)
- García, A.; Goñi, P.; Cieloszyk, J.; Fernandez, M.T.; Calvo-Beguería, L.; Rubio, E.; Fillat, M.F.; Peleato, M.L.; Clavel, A. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 3132–3140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Greub, G.; Raoult, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 413–433. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Goñi, P.; Fernández, M.T.; Rubio, E. Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 339–349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Garajová, M.; Mrva, M.; Vašková, N.; Martinka, M.; Melicherová, J.; Valigurová, A. Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4466. [\[CrossRef\]](#)
- Marín, I.; Goñi, P.; Lasheras, A.M.; Ormad, M.P. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecol. Eng.* **2015**, *74*, 28–32. [\[CrossRef\]](#)
- Mosteo, R.; Ormad, M.P.; Goñi, P.; Rodríguez-Chueca, J.; García, A.; Clavel, A. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): Water reuse possibilities. *Water Sci. Technol.* **2013**, *68*, 575–583. [\[CrossRef\]](#)
- Gomes, T.S.; Vaccaro, L.; Magnet, A.; Izquierdo, F.; Ollero, D.; Martínez-Fernández, C.; Mayo, L.; Moran, M.; Pozuelo, M.J.; Fenoy, S.; et al. Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from Drinking Water Treatment Plants. *Sci. Total Environ.* **2020**, *719*, 137080. [\[CrossRef\]](#)
- Fernández, M.T. Molecular Characterization of Free-Living Amoebae and Identification of Other Parasites from the Water Network of Zaragoza District: Association with Other Microorganisms and Risks for Public Health. (Caracterización Molecular de Amebas de Vida Libre e Identificación de Otros Parásitos en Aguas de Red de la Provincia de Zaragoza: Asociación con Otros Microorganismos y Riesgos para la Salud Pública). Ph.D. Thesis, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, 2014.
- Nisar, M.A.; Ross, K.E.; Brown, M.H.; Bentham, R.; Hinds, J.; Whitley, H. Molecular screening and characterization of *Legionella pneumophila* associated free-living amoebae in domestic and hospital water systems. *Water Res.* **2022**, *226*, 119238. [\[CrossRef\]](#)
- Di Filippo, M.M.; Santoro, M.; Lovreglio, P.; Monno, R.; Capolongo, C.; Calia, C.; Fumarola, L.; D'Alfonso, R.; Berrilli, F.; Di Cave, D. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 3417–3427. [\[CrossRef\]](#)
- Loret, J.F.; Greub, G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2010**, *213*, 167–175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thomas, V. Sensitivity and Resistance of Protozoa to Microbicides. In *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*; Fraiese, A.P., Maillard, J.Y., Sattar, S.A., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp. 155–177.
- Dalrymple, K.; Stefanakos, W.; Trotz, M.A.; Goswami, D.Y. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Appl. Catal. B Environ.* **2010**, *98*, 27–38. [\[CrossRef\]](#)
- Gabriel, A.A.; Panaligan, D.C. Heat and chlorine resistance of a soil *Acanthamoeba* sp. cysts in water. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 453–464. [\[CrossRef\]](#)
- Lonnen, J.; Kilvington, S.; Kehoe, S.C.; Al-Touat, F.; McGuigan, K.G. Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Res.* **2005**, *39*, 877–883. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kilvington, S.; Price, J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* **1990**, *68*, 519–525. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

21. Garcia, M.T.; Jones, S.; Pelaz, C.; Millar, R.D.; Kwaik, Y.A. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 1267–1277. [CrossRef]
22. He, Z.; Wang, L.; Ge, Y.; Zhang, S.; Tian, Y.; Yang, X.; Shu, L. Both viable and inactivated amoeba spores protect their intracellular bacteria from drinking water disinfection. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *47*, 126006. [CrossRef] [PubMed]
23. Muchesa, P.; Bartie, C.; Barnard, T.G. Free-Living Amoebae and Associated Drug-Resistant Bacteria in Surface Waters: A Public Health Concern? In *Parasite and Disease Spread by Major Rivers on Earth. Parasitology Research Monographs*; Mehlhorn, H., Klimpel, S., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; Volume 12, pp. 221–236. [CrossRef]
24. Zhou, P.; Di Giovanni, G.D.D.; Meschke, J.S.; Dodd, M.C. Enhanced Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts during Solar Photolysis of Free Available Chlorine. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2014**, *1*, 453–458. [CrossRef]
25. Remucal, C.K.; Manley, D. Emerging investigators series: The efficacy of chlorine photolysis as an advanced oxidation process for drinking water treatment. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2016**, *2*, 565–579. [CrossRef]
26. Khajouei, G.; Finkle, H.O.; Lin, L.S. UV/chlorine advanced oxidation processes for degradation of contaminants in water and wastewater: A comprehensive review. *J. Environ. Chem. Eng.* **2022**, *10*, 107508. [CrossRef]
27. Forsyth, J.E.; Zhou, P.; Mao, Q.; Asato, S.S.; Meschke, J.S.; Dodd, M.C. Enhanced inactivation of *Bacillus subtilis* spores during solar photolysis of free available chlorine. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 12976–12984. [CrossRef]
28. Chauque, B.J.M.; Rott, M.B. Photolysis of sodium chloride and sodium hypochlorite by ultraviolet light inactivates the trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii* in the water matrix. *J. Water Health* **2021**, *19*, 190–202. [CrossRef]
29. Wang, L.; Mai, Y.; Li, S.; Shu, L.; Fang, J. Efficient inactivation of amoeba spores and their intraspore bacteria by solar/chlorine: Kinetics and mechanisms. *Water Res.* **2023**, *242*, 120288. [CrossRef]
30. Chauque, B.J.M.; Benetti, A.D.; Corção, G.; Silva, C.E.; Gonçalves, R.F.; Rott, M.B. A new continuous-flow solar water disinfection system inactivating cysts of *Acanthamoeba castellanii*, and bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2021**, *20*, 123–137. [CrossRef]
31. Ortillés, A.; Goñi, P.; Rubio, E.; Sierra, M.; Gámez, E.; Fernández, M.T.; Benito, M.; Cristóbal, J.A.; Calvo, B. A rabbit model of *Acanthamoeba* keratitis: Use of infected soft contact lenses after corneal epithelium debridement with a diamond burr. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2017**, *58*, 1218–1227. [CrossRef] [PubMed]
32. Schroeder, J.M.; Booton, G.C.; Hay, J.; Niszl, I.A.; Seal, D.V.; Markus, M.B.; Fuerst, P.A.; Byers, T.J. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 1903–1911. [CrossRef] [PubMed]
33. Claassen, J.A.H.R. The gold standard: Not a golden standard. *BMJ* **2005**, *330*, 1121. [CrossRef]
34. Yuranova, T.; Enea, O.; Mielczarski, E.; Mielczarski, J.; Albers, P.; Kiwi, J. Fenton immobilized photo-assisted catalysis through a Fe/C structured fabric. *Appl. Catal. B. Environ.* **2004**, *49*, 39–50. [CrossRef]
35. United States Environmental Protection Agency. *Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*; Office of Water: Washington, DC, USA, 1999; EPA 815-R-99-014. Available online: <https://www.epa.gov/> (accessed on 20 December 2023).
36. Kahler, A.M.; Cromeans, T.L.; Roberts, J.M.; Hill, V.R. Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus and murine norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 5159–5164. [CrossRef]
37. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 2005; ISBN 08-7553-047-8.
38. Beattie, T.K.; Seal, D.V.; Tomlinson, A.; McFadyen, A.K.; Grimason, A.M. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 2992–3000. [CrossRef]
39. Storey, M.V.; Winiacka-Krusnelli, J.; Ashbolt, N.J.; Stenström, T.A. The Efficacy of Heat and Chlorine Treatment against Thermo-tolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand. J. Infect. Dis.* **2004**, *36*, 656–662. [CrossRef] [PubMed]
40. Coulon, J.; Collignon, A.; McDonnell, G.; Thomas, V. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 2689–2697. [CrossRef] [PubMed]
41. Dupuy, M.; Berne, F.; Herbelin, P.; Binet, M.; Berthelot, N.; Rodier, M.H.; Soreau, S.; Héchar, Y. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2014**, *217*, 335–339. [CrossRef] [PubMed]
42. Erickson, M.C.; Ortega, Y.R. Review: Inactivation of protozoan parasites in food, water and environmental systems. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2786–2808. [CrossRef] [PubMed]
43. Di Cesare, A.; Corno, G.; Manaia, C.M.; Rizzo, L. Impact of disinfection processes on bacterial community in urban wastewater: Should we rethink microbial assessment methods? *J. Environ. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 104393. [CrossRef]
44. Giannakis, S.; Polo, M.I.; Spuhler, D.; Sánchez, J.A.; Fernández, P.; Pulgarin, C. Solar disinfection is an augmentable, in situ-generated photo-Fenton reaction—Part 1: A review of the mechanisms and the fundamental aspects of the process. *Appl. Catal. B Environ.* **2016**, *199*, 199–223. [CrossRef]
45. Adan, C.; Magnet, A.; Fenoy, S.; Pablos, C.; Águila, C.; Marugán, J. Concomitant inactivation of *Acanthamoeba* spp. and *Escherichia coli* using suspended and immobilized TiO₂. *Water Res.* **2018**, *144*, 512–521. [CrossRef] [PubMed]
46. Heaselgrave, W.; Kilvington, S. The efficacy of simulated solar disinfection (SODIS) against *Ascaris*, *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Entamoeba* and *Cryptosporidium*. *Acta Trop.* **2011**, *119*, 138–143. [CrossRef]
47. Dupuy, M.; Mazoua, S.; Berne, F.; Bodet, C.; Garrec, N.; Herbelin, P.; Ménard-Szczebara, F.; Oberti, S.; Rodier, M.H.; Soreau, S.; et al. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res.* **2011**, *45*, 1087–1094. [CrossRef] [PubMed]

48. Shu, L.; Zhang, B.; Queller, D.C.; Strassmann, J.E. *Burkholderia* bacteria use chemotaxis to find social amoeba *Dictyostelium discoideum* hosts. *ISME J.* **2018**, *12*, 1977–1993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Khan, N.A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb. Pathog.* **2003**, *34*, 277–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Inactivation of *Acanthamoeba* and its endosymbiont bacteria by the combination of solar light with H₂O₂

Carmen Menacho^{a,b,c,*}, Carlissa Marez^a, Patricia Chueca^{b,c}, Pilar Goñi^{b,c}, Maria P. Ormad^{a,c}

^a Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, EINA, University of Zaragoza, C/María Luna 3, 50018 Zaragoza, Spain

^b Area of Parasitology, Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, C/Doningo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain

^c Water and Environmental Health Research Group, Environmental Science Institute (IUCA), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords

H₂O₂/SR
Acanthamoeba
Hydrogen peroxide
Solar radiation
Endosymbiont bacteria
Disinfection

ABSTRACT

Disinfection treatments are necessary for the safe use of water, but Free-Living Amoebae (FLA) are known to resist conventional processes, posing a health threat to water users that increases due to the endosymbiont bacteria (EB) FLA can carry inside. Advanced Oxidation Processes are promising disinfection treatments that have been extensively studied on bacteria but have barely been studied on FLA or EB yet. For the first time, the inactivation efficiency of combining H₂O₂ and simulated solar radiation (SR) against *Acanthamoeba* and their EB was evaluated. Its performance was compared to only H₂O₂ and solar radiation (SR) at 280–800 nm. The influence of *Acanthamoeba* origin was also evaluated. Concentrations of 7 to 10 mM H₂O₂ were necessary for inactivating *Acanthamoeba*, but 25 mM was required to kill EB. SR was inefficient for the used-to-solar-exposure *Acanthamoeba* strain. H₂O₂/SR improved the disinfection efficiency of treatments alone. 5 mM of H₂O₂/SR for 5 min eradicated both *Acanthamoeba* and EB, reducing up to 6 and 30 times the H₂O₂ dose and the SR fluence necessary, respectively. The *Acanthamoeba* strain that had already overcome water treatments was more resistant to all the treatments than the freshwater strain. This study underlines the protective role of amoebae in disinfection processes and the wide pathogenic microorganism spectrum that can overcome water treatments thanks to this “trojan horse”. More research is needed to optimize conditions and establish H₂O₂/SR as an efficient disinfection treatment that prevents waterborne and nosocomial infections of endosymbiont microorganisms according to water use.

1. Introduction

Water disinfection is necessary to prevent waterborne diseases [1]. However, there are potentially pathogenic microorganisms that can overcome conventional water treatments and pose a public health threat [2]. Among them, free-living amoebae (FLA) are opportunistic pathogens that develop a cystic stage, which is very resistant to harsh conditions and disinfection treatments such as chlorine or ultraviolet radiation [3]. In addition, FLA can also become a reservoir of potentially pathogenic microorganisms since some bacteria and other microbes can survive inside them after being ingested by the amoeba or after infecting the amoeba. *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. or *Pseudomonas* spp., among others, are common endosymbiont bacteria transported by FLA [4]. Some species, such as *Vibrio cholerae* and *Legionella*

pneumophila can even multiply inside FLA. In addition, endosymbiont bacteria can become more virulent and antibiotic-resistant after their intra-amoeba life [5].

Thanks to FLA protection, pathogenic endosymbiont bacteria can overcome water treatments [6], go through water systems unnoticed by microbiological controls, and colonize tap water, swimming pools, air conditioning devices, cooling towers or even hospital water systems, enhancing the risk of infection among water users [7]. As examples, Fernandez [8] reported the presence of potentially pathogenic endosymbiont bacteria inside FLA isolated from swimming pools and Muchesa et al. [9] detected amoeba-associated *L. pneumophila* in hospital water networks. Regulations play a key role in protecting people from possible infections and outbreaks; however, FLA are neglected across regulations related to water uses where FLA or endosymbiont

* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, EINA, University of Zaragoza, C/María Luna 3, 50018 Zaragoza, Spain.

E-mail address: cmcnacho@unizar.es (C. Menacho).

<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2024.114562>

Received 13 November 2023; Received in revised form 15 January 2024; Accepted 31 January 2024

Available online 2 February 2024

0920-5861/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

infection results concerning [7]. For example, Greek and Italian regulations allow water reuse for cooling towers and condensers, but do not include any protozoa as a microbiological indicator control, underestimating the health risk [10]. These devices are typically colonized by FLA and become infective hotspots for endosymbiont bacteria such as *Legionella pneumophila* [5]. Thus, all these scenarios become a risk for public health and threaten the achievement of sustainable development goal number six, “water safety”, from the 2030 Agency of United Nations [11]. To face this issue, disinfection treatments against FLA and the endosymbiont bacteria they protect inside must be evaluated.

Acanthamoeba spp. is the widest-spread and better-studied FLA genus. It is the most frequently found FLA genus, both in natural and artificial water [4,6], is the cause of different infections, such as keratitis or encephalitis, and can host a wide variety of potentially pathogenic bacteria inside [12]. So, it becomes an interesting model microorganism for studying FLA. Several studies reported that *Acanthamoeba* spp. can resist conventional disinfection processes such as chlorination, ultraviolet radiation or ozonation [13]. Thus, alternative disinfection treatments are necessary.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is known to be one of the most efficient *Acanthamoeba* disinfectants for contact lens care solutions [14]. This compound is also employed as a disinfectant for health-care settings, pipe disinfection and surface decontamination [15]. Indeed, this disinfectant was considered a control mechanism for *Legionella* in the water network of an Italian hospital [16]. However, as far as the authors know, H_2O_2 efficiency against endosymbiont bacteria protected by *Acanthamoeba* has never been evaluated.

Disinfection with UV radiation has been gaining traction in water disinfection in recent years. Its germicidal effect lies in damaging the DNA of microorganisms, impairing their growth or replication [17]. It is an interesting treatment that avoids the formation of the carcinogenic organochlorides produced by chlorination [18]. The high energy input requirement of UV lamps is a disadvantage to consider, especially in developing areas. Thereby, solar radiation, as a natural UV source, is gaining interest as an environmentally sustainable and low-cost disinfection treatment [17]. However, its efficiency varies depending on the targeted microorganism. Lonnen et al. [19] reported that a 5-log reduction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was achieved after 2.5 h of solar radiation, while *A. polyphaga* cysts showed less than a 1-log reduction after 8 h of treatment. Thus, protozoa and, probably more worrisome, endosymbiont bacteria are still an open issue in solar radiation disinfection.

The inactivation of microorganisms can be improved by Advanced Oxidation Processes (AOPs). AOPs rely on hydroxyl radicals (OH) and other reactive oxygen species (ROS) formation, very reactive molecules that attack non-selectively, degrading compounds and inactivating microorganisms [20]. Solar-driven AOPs, also found in literature as photo-induced AOPs, have raised interest in the last decades as long as they reduce considerably treatment costs and turn the treatment into a clean technology [21,22]. Combining H_2O_2 and solar radiation (H_2O_2 /SR) turns into a solar-driven AOP, known to be effective as a disinfection treatment against *Escherichia coli* [23], total faecal coliforms, *Enterococcus* [22], *Legionella jordanis* [24], *Pseudomonas aeruginosa*, MS2 virus [25], somatic coliphages, F-specific RNA bacteriophages [26], *Fusarium solani* [27] and *Fusarium equiseti* chlamydispores [28]. H_2O_2 /SR avoids photocatalyst removal or pH corrections post-treatments as long as H_2O_2 auto-decomposes into water and oxygen [29], turning the treatment into an advantageous solar-driven AOPs. Indeed, it has been evaluated as a wastewater treatment for small urban wastewater treatment plants [23], as a tertiary wastewater treatment [30] and for reclamation purposes [26]. Thinking of *Acanthamoeba* and BE public health risks, H_2O_2 /SR seems like an attractive process for disinfecting closed-water systems where these microorganisms can be specially threatening, such as swimming-pool, spas, hospital or health-care water systems.

The efficiency of some AOPs and solar-driven AOPs, such as chlorine

photolysis or TiO_2 photocatalysis, against amoebae [19,31] and, in a few cases, against bacteria protected by amoebae [32,33] has already been evaluated, but the efficiency of H_2O_2 /SR has never been evaluated against *Acanthamoeba* or their endosymbiont bacteria. Thus, the main goal of the present study is to evaluate the efficiency of combining H_2O_2 and simulated solar radiation (H_2O_2 /SR) inactivating *Acanthamoeba* (FLA) and their endosymbiont bacteria (EB) protected inside the isolated amoeba. The efficiency of H_2O_2 /SR was compared to the efficiency of H_2O_2 and solar radiation (280–800 nm) treatments alone. The influence of H_2O_2 and solar radiation (SR) doses and the water source where *Acanthamoeba* strains come from were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. *Acanthamoeba* strains evaluated

Two different FLA strains were tested: *Acanthamoeba* P31 (GenBank accession No. KY038362), isolated from an open swimming pool in Zaragoza, Spain [34] and *Acanthamoeba* C1–211, isolated from the freshwater of the river Noguera Ribagorçana in Lérida, Spain. Isolation was performed as described by Garcia et al. [4], and PCR and further sequencing were performed as described by Schroeder et al. [35]. The sequence was compared with the GeneBank database with the BLAST bioinformatic tool, and it was registered under the accession number OQ927217.

Both strains were grown at 30 °C in protease peptone, yeast extract and glucose (PPYG) medium supplemented with 250 µg/mL streptomycin, 250 µg/mL penicillin and 30 µg/mL fungizone to avoid contamination until trophozoite encystation occurred.

2.2. Disinfection treatments: preparation, conditions, development and sampling

Disinfection treatments evaluated were hydrogen peroxide (H_2O_2) and its combination with solar radiation (H_2O_2 /SR). Before each treatment, FLA inoculums were prepared by centrifugation at 6000g for 10 min from PYPG medium axenic cultures and washing in a saline solution (0.9% NaCl) afterward. Taking a 3-log removal as a criterion of efficient disinfection [36], the FLA initial concentration was adjusted between $1 \cdot 10^4$ to $2 \cdot 10^4$ cells/mL. All the assays were developed at room temperature in batch reactors with a perfect blend. Reactors consisted of sterilized pyrex glass open beakers with a volume of 20 mL under constant agitation. H_2O_2 disinfection assays were developed in dark conditions and prepared by diluting hydrogen peroxide 30%, v/v, Panreac Química S.L.U. (Barcelona, Spain) in ultrapure sterilized water. H_2O_2 /SR assays were conducted in an Atlas Suntest CPS+ /XLS+ solar chamber provided with a xenon lamp. This system reproduces natural sunlight conditions. Samples were exposed to wavelengths between 280 and 800 nm. All the assays were carried out with 500 W/m² which corresponds to 50% of the light intensity of the midday equatorial solar radiation [17]. The temperature was maintained below 30 °C during the assays so that only solar radiation (and not heating) was involved during the disinfection process.

Concentrations of H_2O_2 studied ranged between 1 and 25 mM (34 and 1700 mg/L), according to a previous screening test [37]. The maximum exposure time was set to 30 min. For H_2O_2 assays, aliquots were sampled at the initial and final times of the assay. In the case of H_2O_2 /SR assays, samples were also taken during the experiment. An assay without H_2O_2 in darkness was evaluated as a control. To determine only the SR effect, an assay without H_2O_2 under SR was also evaluated. The survival of *Acanthamoeba* (FLA), the survival of their endosymbiont bacteria (EB), and the residual H_2O_2 concentration were evaluated from aliquots. Assays were performed in duplicate.

H_2O_2 initial and residual concentrations were measured following the spectrophotometric method using metavanadate from Nogueira et al. [38]. Absorbance was read by a Jenway™ 6305 UV/visible

spectrophotometer (Fisher Scientific S.L., Madrid, Spain) at 450 nm. SR exposure was quantified by the SR dose or fluence (F), which is calculated as the product of the light intensity and the exposure time: $F = \text{light intensity (W/m}^2) \times \text{time (s)}$, in W.s/m^2 [39,40].

2.3. Determination of *Acanthamoeba* inactivation

The survival of *Acanthamoeba* was determined using the most probable number (MPN) procedure adapted from Beattie et al. [41]. A sodium thiosulfate solution was added to the aliquots for H_2O_2 neutralization. 10 μL of the aliquots sampled and their dilutions (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) were inoculated onto Non-Nutrient Agar (NNA) plates covered by heat-inactivated *Escherichia coli*. Each inoculation was performed in quintuplicate. Also, 100 μL of the aliquots sampled were inoculated in quintuplicate on a plate. Plates were incubated during 15 days at 30 °C and regularly observed under an optical microscope looking for presence or absence of growth. Results were reported using an MPN table [41]. If no amoebic growth was detected in the 10 μL aliquots, then the 100 μL aliquots were checked for growth; no growth indicated total kill of the amoebae.

FLA inactivation was defined as a logarithmic reduction (N/N_0), where N_0 and N were the most probable numbers of viable cells before and after time of the treatments. For H_2O_2 assays, FLA inactivation was recorded as a function of H_2O_2 concentration (mmol/L and mg/L). In the case of H_2O_2 /SR assays, FLA inactivation was recorded as a function of exposure time (min) and as a function of fluence (KW.s/m^2).

The necessary H_2O_2 concentration and fluence for a 2-log ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{99\%}$, $F_{99\%}$) and a 3-log ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{99.9\%}$, $F_{99.9\%}$) FLA reduction were estimated from the linear regression section of the FLA inactivation curves. FLA inactivation curves were obtained by Microsoft Excel 365 Software.

2.4. Determination of EB inactivation

The survival of the environmental EB protected and carried by the *Acanthamoeba* under study was determined qualitatively. A sodium thiosulfate solution was added to the aliquots for H_2O_2 neutralization. 100 μL of the aliquots sampled were inoculated in quintuplicate on a Mueller Hinton plate. Plates were incubated during 48 h at 37 °C and observed for the presence or absence of growth. Aliquots sampled from control assays were used to compare endosymbiont bacterial growth. Results are expressed as three qualitative categories: non-affected survival if bacteria growth was similar to control; affected survival if a reduction of bacteria growth was appreciated compared to control; and inactivation of bacteria if no bacteria growth was detected after the treatment. The necessary H_2O_2 concentration (mmol/L) and F (KW.s/m^2) for EB total inactivation were described by the conditions that led to a total absence of bacterial growth under the conditions studied.

3. Results and discussion

3.1. Inactivation of *Acanthamoeba* by H_2O_2 treatment

H_2O_2 has been used for many years as a disinfectant for drinking water treatments, decontamination of medical devices [42] or biofilm growth control [43] due to its efficacy against a wide spectrum of microorganisms and reasonable manipulation safety. It is also considered an environmentally friendly treatment as long as no toxic by-products are produced, in contrast to chlorination treatments [16]. The efficiency of H_2O_2 against *Acanthamoeba* has been especially studied for contact lens formulation purposes [13] but, as far as the authors know, never for water treatment purposes, which are less demanding.

To determine the disinfection effectiveness of H_2O_2 , *Acanthamoeba* inactivation was evaluated after 30 min of exposure to H_2O_2 concentrations that varied from 1 to 25 mM (Fig. 1). As H_2O_2 concentration increased, the number of *Acanthamoeba* cells was gradually reduced.

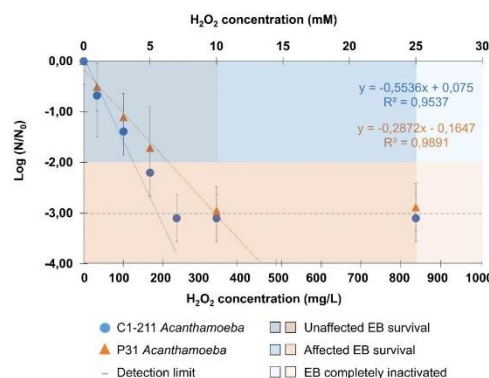


Fig. 1. Inactivation of *Acanthamoeba* and their EB after H_2O_2 treatment. The darkest blue (C1-211) and orange (P31) back colors indicate that EB survival was not affected; the intermediate blue and orange colors indicate that EB survival was affected; the clearest blue and orange colors indicate that EB were totally inactivated.

Total inactivation was reached after exposure to 7 mM (238 mg/L) and 10 mM (340 mg/L) H_2O_2 for 30 min in the cases of C1-211 and P31 *Acanthamoeba*, respectively. Necessary H_2O_2 doses for achieving a 2-log and 3-log reduction of *Acanthamoebae* (Table 1) were estimated through the equation obtained from the linear part of the graphic (Fig. 1). C1-211 *Acanthamoeba* required 3.7 and 5.6 mM of H_2O_2 to be reduced 2 and 3 logarithmic units, respectively. P31 *Acanthamoeba* required higher doses: 6.4 and 9.9 for a 2- and a 3-log reduction, respectively.

Comparing with the literature, the evaluated strains were much more sensitive than most of the *Acanthamoeba* strains evaluated so far [13], but most of these studies correspond to contact lens formulation analyses in which high doses (in the molar range rather than millimoles) and especially resistant *Acanthamoeba* strains are evaluated. The sensitivity of FLA to disinfectants is highly variable among amoeba genera, species and strains; for example, Coulon et al. [3] reported resistances to H_2O_2 among different *Acanthamoeba* strains that varied from less than a 1-log reduction after 30 min to a 4.8-log reduction after 20 min. It might also be considered that such high resistances reported before corresponded to cysts, while the inoculums here evaluated contain some trophozoites and immature cysts, which are more sensitive than cysts [44].

The *Acanthamoeba* cyst wall is composed of two highly impermeable layers, the endocyst and the ectocyst, made up of a complex polysaccharide based on glycans and cellulose fibrils [45]. Pores are found where the endocyst and the ectocyst meet. The number of these pores, the cyst wall thickness and the cystic age might influence the susceptibility to chemical disinfectants and biocides of every strain [46]. This might explain the differences found in C1-211 and P31 *Acanthamoeba* H_2O_2 susceptibility, and also the differences with *Acanthamoeba* strains reported before, though other factors might also be involved. It should be considered that H_2O_2 disinfection studies are difficult to compare as long as experimental conditions are completely different regarding disinfection purpose, strains targeted, water matrix or contact time. Even units of measure lack standardization: mg/L, % (w/v), % (v/v) or mM are mixed across literature [15].

3.2. Inactivation of endosymbiont bacteria by H_2O_2 treatment

The bacterial vector and protector roles of amoebae have been widely studied so far. Several reviews reported the huge variety of

Table 1
Disinfectant doses for a 2-log and a 3-log *Acanthamoeba* reduction and EB eradication. H_2O_2 concentration (mM) and fluence (KW.s/m^2) for a 2-log ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{99\%}$ and $F_{99\%}$) and 3-log ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{99.9\%}$ and $F_{99.9\%}$) reduction of FLA and for eradication of EB ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EB}}$ and F_{EB}).

Treatment	C1-211			P31		
	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{99\%}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{99.9\%}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EB}}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{99\%}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{99.9\%}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EB}}$
Treatment	$F_{99\%}$	$F_{99.9\%}$	F_{EB}	$F_{99\%}$	$F_{99.9\%}$	F_{EB}
SR	162.1	292.3	900	-	-	> 900
1 mM H_2O_2 /SR	57.3	87.4	900	163.3	277.2	900
3 mM H_2O_2 /SR	47.2	68.6	300	34.7	56.7	900
5 mM H_2O_2 /SR	10.6	15.8	150	19.1	29.0	150

bacteria genera and other microorganisms- amoebae can carry inside, many of them potentially pathogenic for human health [5,7]. However, disinfecting bacteria protected inside amoebae has barely been studied; only chlorine, monochloramine, chlorine dioxide, $\text{UV}_{254\text{ nm}}$ and chlorine photolysis against bacteria protected by amoebae have been evaluated so far [33,36,47]. Thus, this is the first study in which the effect of H_2O_2 disinfecting bacteria protected by amoebae was analyzed.

To determine the inactivation effectiveness of H_2O_2 against EB, bacteria's survival was evaluated by the presence or absence of bacterial growth after 30 min of exposure to H_2O_2 concentrations that varied from 1 to 25 mM. In Fig. 1, colors represent the three qualitative categories established for EB survival. Results show that both C1-211 and P31 EB required an exposure time of 30 min to 25 mM (850 mg/L) H_2O_2 to get inactivated. According to Mohammed [48], 35 mg/L of H_2O_2 (1 mM) can control waterborne bacteria, suggesting that bacteria might resist higher H_2O_2 doses when protected inside amoebae than free bacteria. This fact was already demonstrated with chlorine; Garcia et al. [49] reported that *L. pneumophila* resisted four times higher chlorine doses while being protected by *A. polyphaga*.

Comparing with H_2O_2 inactivating FLA results, between 2.5 and 3.5 higher disinfectant doses were necessary to inactivate EB than to inactivate the *Acanthamoeba* that carries them inside (Fig. 1 and Table 1). This agrees with reports by He et al. [47], who found that the *Burkholderia* bacterium required higher doses of chlorine and chlorine dioxide than its protective *Dictyostelium discoideum* amoeba to get inactivated. These results underline the strong protective role of amoebae, which might be related to the cyst wall's robustness and the H_2O_2 action mechanism.

H_2O_2 affects microorganisms through internal and external damage [43]. On the one hand, internal damage is related to $\cdot\text{OH}$ radical generation through intracellular Fenton reactions, produced when H_2O_2 is combined with mainly ferrous but also ferric inner ions [50], DNA damage [43] and mitochondrial function affection [51]. On the other hand, the external mechanism of H_2O_2 damage is based on the cell wall attack and permeability increase, which allow extra H_2O_2 inflow and further damage as well as an overall detrimental effect on cell viability [43].

As shown in Fig. 1, P31 EB survival was affected by all the H_2O_2 doses evaluated. On the contrary, C1-211 EB survival remained unaffected until C1-211 *Acanthamoeba* was completely inactivated. A higher proportion of P31 trophozoites than cysts might be present during the assays, which are more sensitive, and the affected P31 EB at lower H_2O_2 doses might be those liberated by the affected and dead trophozoites. Regarding C1-211 results, its EB might be well protected and not released outside, even though the disinfectant might penetrate C1-211 trophozoites and cysts and inactivate them. Maybe the cell compartment endosymbiotic bacteria inhabit inside amoebae [5] or the expulsion of vesicles fulfilled with EB by amoebae, which can also provide protection [7], may influence EB inactivation to some extent.

European Union regulations establish 25 mg/L (0.7 mM) H_2O_2 as the maximum dose for drinking water disinfection and accept 5 mg/L as the residual concentration [52]. The United States Environmental Protection Agency [39] recommends a residual concentration of H_2O_2 between

25 mg/L (0.7 mM) and 50 mg/L (1.5 mM) in drinking water. Taking these regulations into account, C1-211 and P31 *Acanthamoeba* as well as their EB, can easily overcome water treatment plants based on this disinfecting process, colonize water systems as pipes, taps, fountains or hospital showers, among others [7] and pose a health threat to people exposed. Thus, effective alternatives to H_2O_2 disinfection are necessary to inactivate *Acanthamoeba* and EB.

3.3. Inactivation of *Acanthamoeba* and endosymbiont bacteria by SR treatment

Solar radiation (SR) has been widely used due to its germicidal power. The wavelength range that arrives at the Earth comprises 290 nm to 800 nm that is, UV-B and UV-A [17], similar to the wavelength range used in this study. This radiation inactivates microorganisms in a direct (DNA dimer formation and damage) and indirect (oxidative damage produced by the increase of intracellular ROS and photo-Fenton reactions) way [43]. This environmentally friendly and cost-effective disinfection process proved to be especially effective against some bacteria and viruses, but protozoa are known to be more resistant [39].

To determine the effectiveness of SR, FLA and EB inactivation were evaluated at different times during 30 min of exposure to 500 W/m^2 of simulated SR. Necessary SR fluence for achieving a 2-log and 3-log reduction of *Acanthamoeba* (Table 1) were estimated through the equation obtained from the linear part of the graphic (Fig. 2.a and 2.b). Results show that FLA (Fig. 2.a and 2.b) and EB inactivation (Fig. 3) were dependent on the UV dose: the longer the exposure, the higher the inactivation rate achieved. C1-211 *Acanthamoeba* required 10 min of SR to be totally inactivated ($F = 300\text{ KW.s/m}^2$). In the case of P31 (Fig. 2.b), SR achieved a 2-log *Acanthamoeba* reduction during the first 5 min and it was maintained up to 30 min, not achieving total inactivation. P31 *Acanthamoeba* initial reduction might correspond with trophozoite or immature cyst inactivation (that can be present in the initial inoculum of the assays), whereas cysts might remain viable and require more than 900 KW.s/m^2 to be completely inactivated. This result agrees with reports by Lonnen et al. [19] who stated that $\text{SR}_{300\text{ nm} - 10\text{ }\mu\text{m}}$ was effective in inactivating *A. polyphaga* trophozoites, but ineffective against the cysts.

Comparisons with the literature are complicated due to differences in UV radiation wavelengths and light intensities. Still, C1-211 and P31 *Acanthamoeba* strains are more sensitive than the *A. castellanii* cysts irradiated with 550 W/m^2 of $\text{SR}_{290-800\text{ nm}}$ that were 2-log reduced after 2 h of treatment ($F_{99\%} = 3960\text{ KW.s/m}^2$) by Heaselgrave and Kilvington [53]. *Acanthamoeba* strains under study are also more sensitive than the *A. polyphaga* evaluated by Lonnen et al. [19], whose trophozoites achieved a 3-log reduction after 2 h ($F_{99.9\%} = 7200\text{ KW.s/m}^2$), while cysts were reduced less than a 1-log after 8 h of 870 W/m^2 of $\text{SR}_{300\text{ nm} - 10\text{ }\mu\text{m}}$ ($F = 28800\text{ KW.s/m}^2$).

Like H_2O_2 disinfection assays, disinfectant doses to inactivate EB were higher than those necessary to inactivate their protective *Acanthamoeba*. C1-211 EB required three times the necessary fluence ($F_{\text{EB}} = 900\text{ KW.s/m}^2$) to totally inactivate the protective *Acanthamoeba*. In the

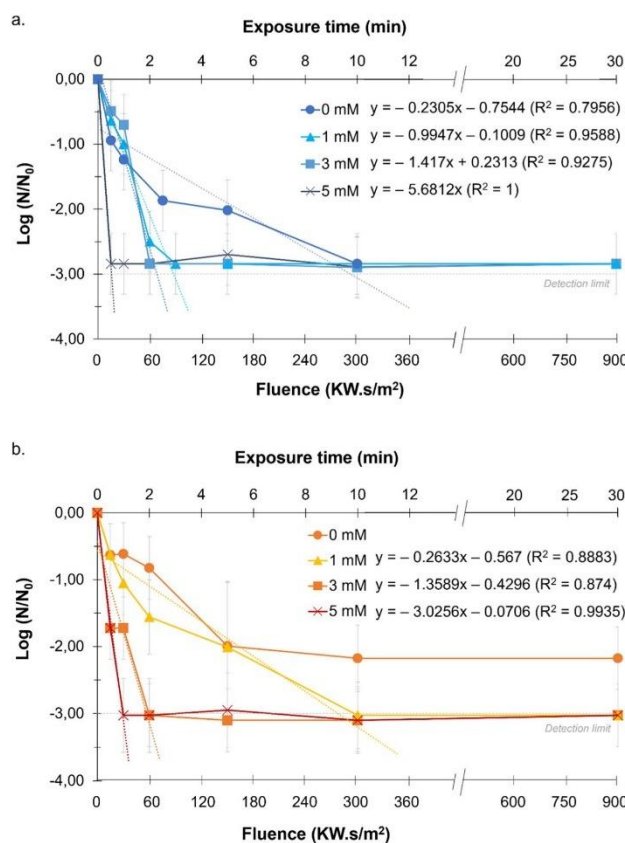


Fig. 2. Inactivation of (a) C1-211 and (b) P31 *Acanthamoeba* along SR and H_2O_2 /SR treatments with different H_2O_2 doses.

case of P31 EB, since 30 min of SR exposure were not enough to inactivate P31 *Acanthamoeba*, they were also not enough to inactivate their EB (Fig. 3.b); thus, doses higher than 900 KW.s/m² of SR exposure are necessary. This fact was also reported by Adan et al. [32], who found that 150 min of UVA radiation barely affected *Escherichia coli* in the presence of *Acanthamoeba*. However, *E. coli* survival was not related to amoeba protection but to amoeba scattering of UV light. The present results also agree with the reports by He et al. [47], who described that *Dictyostelium discoideum* amoeba was able to protect the *Burkholderia* bacterium inside even after being inactivated by UV_{254 nm}. He et al. [47] suggested that cysts can absorb and screen UV light, so that protected bacteria can only be attacked by a fraction of UV light.

As solar radiation did not achieve efficient inactivation of P31 *Acanthamoeba* or P31 EB, alternative disinfection treatments are still necessary.

3.4. Inactivation of *Acanthamoeba* and endosymbiont bacteria by H_2O_2 /SR treatment

Combining H_2O_2 with solar radiation can become a highly efficient disinfection treatment that considers H_2O_2 , solar radiation and

Advanced Oxidation Process (AOP) advantages. The microbial inactivating mechanism of the H_2O_2 /SR treatment is controversial and still remains unclear [26]. Most of the studies developed so far evaluate the inactivation of bacteria; however, this is the first study in which the inactivation of amoebae and endosymbiont bacteria has ever been evaluated.

To determine the effectiveness of H_2O_2 /SR, *Acanthamoeba* (Fig. 2.a and 2.b) and EB (Fig. 3) inactivation were evaluated at different times during 30 min of exposure to H_2O_2 concentrations that varied from 1 to 25 mM combined with 500 W/m² of simulated SR. As a rule, results show that the H_2O_2 and SR combination enhanced the inactivation of both *Acanthamoeba* and EB, compared with H_2O_2 and SR treatments alone, which agrees with previous studies [22–28], in which the inactivation of *E. coli*, total faecal coliforms, *Enterococcus*, *Legionella jordanis*, *Pseudomonas aeruginosa*, MS2 virus, somatic coliphages, F-specific RNA bacteriophages *Fusarium solani* and *F. equiseti* by H_2O_2 /SR was evaluated. Indeed, the total inactivation of P31 *Acanthamoeba* was achieved at any of the H_2O_2 doses evaluated under H_2O_2 /SR experiments, while it was not achieved by only SR treatment. This agrees with reports by Chauque and Rott [31], who found that the NaOCl/UV AOP could inactivate *A. castellanii* while only UV radiation could not.

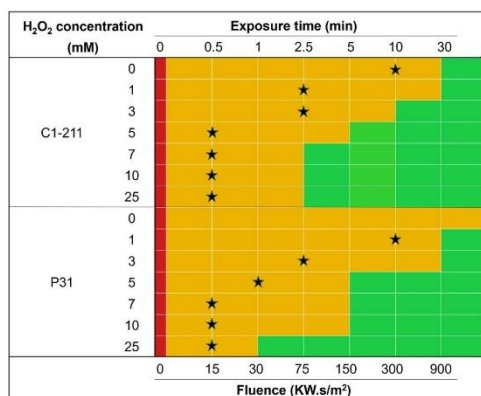


Fig. 3. Inactivation of C1-211 and P31 EB after SR and H_2O_2 /SR treatments. Bacteria survival is semiquantitative indicated in colors: red color means unaffected bacterial survival, orange color means affected bacterial survival and green color means completely inactivated bacteria. Black stars indicate the exposure time and fluence necessary to inactivate the corresponding FLA at the different H_2O_2 doses evaluated.

Combining 1 mM H_2O_2 (34 mg/L) and SR, the necessary time and fluence to inactivate C1-211 and P31 FLA were reduced 3–4 folds compared to only SR treatment (from 300 and higher than 900 $KW.s/m^2$ to 75 and 300 $KW.s/m^2$, respectively), while EB inactivation was barely improved ($F = 900 \text{ KW.s/m}^2$). 3 mM H_2O_2 /SR sharpened the reduction of the necessary exposure time to inactivate *Acanthamoeba* P31 five times (60 W/m^2) but did not improve the EB inactivation ($F_{EB} = 900 \text{ KW.s/m}^2$). In the case of C1-211, contrastingly, 3 mM H_2O_2 /SR (102 mg/L) maintained FLA and reduced EB inactivation time and fluence to 300 $KW.s/m^2$. This fact was also observed in the 5 mM H_2O_2 /SR (170 mg/L) assays against P31; FLA inactivation was barely improved compared to the 3 mM H_2O_2 /SR treatment, while the necessary time and fluence to inactivate its EB were reduced. This suggests that, under 1 mM or 3 mM H_2O_2 /SR treatment for C1-211 and P31, respectively, the inactivation mechanism(s) were not enough to reach and attack endosymbiont bacteria, but higher H_2O_2 doses might enhance them to a greater extent that causes EB inactivation.

Increasing H_2O_2 doses to 5 mM accelerated sharply both FLA and EB inactivation: C1-211 and P31 FLA were totally inactivated 20 and higher than 30 times faster (15 and 30 $KW.s/m^2$, respectively), and their EB were totally inactivated at least 6 times faster compared to only SR treatments (150 $KW.s/m^2$ for the EB of both *Acanthamoeba*). These results agree with reports by Polo-López et al. [24] and Martínez-García et al. [25], who proved that 0.3 mM and 0.03 mM H_2O_2 /SR reduced 3 and > 20 folds the necessary SR exposure time to inactivate *L. jordanis* and MS2 virus, and that increasing to 1.5 mM and 0.15 mM H_2O_2 enhanced inactivation until reducing 6 and 100 folds the necessary exposure time, respectively, compared with only SR treatment. Mamane et al. [20] evaluated the inactivation of different viruses and *E. coli* through H_2O_2 /UV ($\lambda > 295 \text{ nm}$) and also found that it increased with the initial H_2O_2 dose, agreeing with the results here obtained.

There is evidence that a synergistic effect between SR and H_2O_2 takes place [28]. The high efficiency of the H_2O_2 /SR treatment might be due to the combination of multiple mechanisms that accumulate cellular damages and inactivate the FLA and EB under study: (1) the H_2O_2 internal and external damage, (2) the SR direct and indirect damage, (3) the damage produced by the OH formed through H_2O_2 photolysis, though it might be lower than H_2O_2 /UV-C treatments due to the H_2O_2

UV absorbance spectra [54]; and (4) the (photo-)Fenton reactions developed after inner iron ions release due to direct UV and indirect ROS damage to iron-containing clusters [43] and iron-containing proteins [28]. All these mechanisms produce highly reactive ROS and, especially, OH, which is responsible for initiating free radical and cytotoxic reaction cascades that damage DNA, proteins and lipids. Temperature increase is also known to promote microbial inactivation during the H_2O_2 /SR process [28], but under the experimental conditions stated, it is not considered for so, as long as it was controlled and maintained up to 30 °C throughout the treatments.

In addition, some reactions that take place intra- and extra-cellularly might feed back themselves; as shown in Table 2, in H_2O_2 /SR treatments, H_2O_2 concentration showed an initial decrease but a latter increase that even implies concentrations higher than initial ones. Under solar light, H_2O_2 cellular regulation systems such as catalase and superoxide dismutase (SOD) enzymes, are hampered, leading to an H_2O_2 over-accumulation [55], which could be liberated once the amoebae and/or the bacteria are damaged, increasing extracellular levels.

Further and fundamental studies, as well as ultrastructural analyses similar to those developed by He et al. [47] and Wang et al. [33], should be developed to better understand the inactivation mechanisms that may occur during both *Acanthamoeba* and BE inactivation by H_2O_2 /SR treatment and optimize disinfection conditions.

Increasing to 7 mM H_2O_2 /SR reduced the necessary time to inactivate C1-211 EB to 2.5 min (75 $W.s/m^2$) and to 0.5 min (15 $KW.s/m^2$) the necessary time to inactivate P31 *Acanthamoeba*. 10 mM H_2O_2 /SR did not improve *Acanthamoeba* or EB inactivation. 25 H_2O_2 mM combined with SR reduced the P31 EB eradicating time to 1 min ($F_{EB} = 30 \text{ KW.s/m}^2$), while in the case of C1-211, results were maintained even though the H_2O_2 doses increased. The fact that the inactivation improvement with increasing H_2O_2 doses to 7 mM (238 mg/L) or higher is hardly significant might be due to a saturation effect of H_2O_2 , while a decrease in the efficiency of degradation would be due to the H_2O_2 quencher effect [50]. Indeed, this saturation effect was also reported by Polo-López et al. [28] and Agulló-Barceló et al. [26], who reported that *Fusarium solani* and that *E. coli* F-specific RNA bacteriophages, somatic coliphages and sulphite-reducing clostridia inactivation was the same at 15 and 10 mg/L, and at 20 and 50 mg/L, respectively. On the other hand, Adeel et al. [23] reported the quencher effect when evaluating *E. coli* inactivation through H_2O_2 /SR: 40 mg/L (1.2 mM) of H_2O_2 improved the inactivation compared to SR, while 90 mg/L (2.6 mM) decreased it.

Considering the saturation effect and the results, 5 mM H_2O_2 /SR (170 mg/L) during 5 min ($F = 150 \text{ KW.s/m}^2$) stands as an effective disinfection treatment against both *Acanthamoebae* and EB. Lower H_2O_2 doses (between 1 and 50 mg/L, 0.03 and 1.5 mM) were reported to be efficient in H_2O_2 /SR assays against bacteria and phages [23–26] and also against some fungal species [27,28], but were not efficient against more resistant microorganisms, such as *B. subtilis* spores [20], *Clostridium perfringens* spores [56] or *Cryptosporidium parvum* oocysts [57]. Thus, it would be interesting to evaluate the H_2O_2 doses here reported as efficient in further H_2O_2 /SR studies against these resistant microorganisms.

3.5. Considerations, relevance of the study and future perspectives

P31 *Acanthamoeba* was more resistant than C1-211 to the three treatments compared (H_2O_2 , SR and H_2O_2 /SR). This might be related to differences in cystic wall composition, as commented in 3.1., but also to the water source. P31 *Acanthamoeba* was isolated from an outdoor swimming pool, where it is constantly exposed to solar radiation and chlorine. Hence, a higher resistance of P31 *Acanthamoeba* and its EB to the SR treatment can be expected. In addition, chlorine, when irradiated by solar radiation, produces OH among other reactive species [31], and thus, this amoeba is used to the exposure and attack of OH radicals. Therefore, P31 *Acanthamoeba* is understandably more resistant than

Table 2

H₂O₂ residual concentration (mM) in dark H₂O₂ and H₂O₂/SR experiments with diferent initial H₂O₂ doses.

Treatment	Time (min)	C1 211				P31			
		1 mM	3 mM	5 mM	10 mM	1 mM	3 mM	5 mM	10 mM
H ₂ O ₂ /SR	0	1.04	3.06	5.03	10.02	1.00	3.07	5.01	10.02
	2.5	0.99	2.96	4.85	9.74	1.54	1.70	4.92	8.79
	5	0.94	2.88	4.67	9.35	1.41	1.58	4.99	9.83
	10	0.92	2.93	4.31	10.30	1.03	1.42	5.03	9.94
	30	0.80	3.53	5.67	11.13	1.38	1.65	5.66	10.95
H ₂ O ₂	30	0.99	2.77	4.60	9.88	0.68	2.09	3.56	9.80

C1–211 to the evaluated treatments.

Previous studies also reported that *Acanthamoeba* strains isolated from urban water, such as hospital water, were more resistant to H₂O₂ and other disinfectants than freshwater *Acanthamoeba* strains [3]. Water treatments select resistant strains that might get into water distribution systems. If ineffective disinfection treatments are included throughout the distribution systems, especially highly resistant *Acanthamoeba* strains might be selected. In addition, considering the increase in the reuse and reclaiming of water [10], *Acanthamoeba* and their endosymbiont bacteria might become recalcitrant in the urban water cycle. All this reinforces the necessity of introducing point-of-use treatments and revising regulated microbial indicators for determined water uses where *Acanthamoebae* and their potentially pathogenic endosymbiont bacteria could pose a health risk, such as swimming pools for elderly people or infants, hospital water or health-care settings. In this sense, point-of-use H₂O₂/SR disinfection could be an interesting alternative, but residual concentrations (Table 2) might be accordingly considered. Optimizations of doses and exposure times could lead to better-fitting treatments. Also, further H₂O₂/SR studies against different *Acanthamoeba* strains and FLA genera and against potential EB non-culturable by the techniques here evaluated are necessary so that optimal conditions for effective disinfection can be stated.

As a hypothesis, it is proposed that EB could be killed (a) once they release out of a dead and lysed *Acanthamoeba* trophozoite or immature cyst or (b) once the disinfectant (whether H₂O₂, ·OH and other ROS or SR) reaches the bacteria inside the *Acanthamoeba*. In the latter case, the efficiency of the disinfectant would depend (among others) on the location of the EB, as long as they can be distributed among different *Acanthamoeba* compartments (in vacuoles or between the walls of the endocyst and ectocyst, for example [5]).

FLA can carry a huge variety of potential pathogenic microorganisms inside; long lists of different bacteria, viruses including SARS-CoV-2 or fungi can be found across the literature [5,58]. Just like endosymbiont bacteria require higher doses than FLA to get completely inactivated, other potentially pathogenic organisms protected inside FLA might also require them. This sharpens the risk of recolonization of water systems and hampers pathogen control. In this sense, further research on disinfecting other microorganisms susceptible to being protected by FLA would be interesting to analyze so that a more complete vision of the protective and “trojan horse” roles of amoebae could be stated. Also, further studies considering different factors such as water matrix, turbidity, ions, quenchers or organic matter are needed.

4. CONCLUSIONS

The combination of H₂O₂ and simulated solar radiation (H₂O₂/SR) was evaluated to compare its effectiveness on the inactivation of two *Acanthamoeba* strains isolated from different water sources and their endosymbiont bacteria to H₂O₂ and SR treatments alone. H₂O₂ was sufficient to obtain eradication, whereas only SR was not. The disinfectant power of H₂O₂ and SR was greatly improved when combined. H₂O₂/SR was efficient in inactivating both *Acanthamoeba* and their EB, reducing the necessary H₂O₂ dose up to 5 times and the necessary SR exposure time up to 30 times.

EB required higher H₂O₂ doses and longer SR exposure times than their protective *Acanthamoeba* to be eradicated, indicating that EB inactivation needs first the *Acanthamoeba* inactivation, underlying the protective role of amoebae against disinfectants. The *Acanthamoeba* strain isolated from a swimming pool, where it is constantly exposed to chlorine and solar radiation, was more resistant than the freshwater strain to all the treatments evaluated, indicating that conventional disinfection treatments select resistant strains that will be pretty difficult to further remove. These strains can hence become recalcitrant in the urban water cycle and enable the possible recolonization of water devices by the potentially pathogenic bacteria carried inside.

Given the resistance of *Acanthamoeba* and their protective role, it is considered of interest to extend knowledge of the effectiveness of H₂O₂/SR on a wider spectrum of free-living amoebae and their endosymbiont microorganisms, including bacteria, viruses and fungi, in order to optimize disinfection conditions and develop H₂O₂/SR as an efficient treatment that could fit according to water uses, protecting users from potential waterborne and nosocomial infections.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: All authors reports financial support was provided by Spanish Ministry of Science Technology and Innovations. All authors reports financial support was provided by Vice Chancellor of Scientific Policy of the University of Zaragoza. Carmen Menacho reports financial support was provided by Government of Aragón (Spain). If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This Special Issue is dedicated to honor the retirement of Prof. Santiago Esplugas at the Universitat de Barcelona (UB, Spain), a key figure in the area of Catalytic Advanced Oxidation Processes. This work was financed by Government of Aragón (Spain) (Research Reference Team Water and Environmental Health B43_23R) and co-financed by Feder 2014–2020 “Building Europe from Aragón”. This work is part of the Project TED2021–129267B-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by the “European Union NextGenerationEU/PRTR”. This work is part of the YZ2022-SAL-01 project, funded by the Vice Chancellor of Scientific Policy of the University of Zaragoza. The authors also thank Government of Aragón for a PhD grant awarded to Carmen Menacho Miralles.

References

- [1] World Health Organization, Guidelines for drinking water quality, fourth ed., Incorporating the first and second addenda, Geneva, Switzerland, 2022. ISBN 978-92-4-610 004506-4. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064>
- [2] M. Benito, C. Menacho, P. Chueca, M.P. Ormad, P. Goñi, J. Environ. Manag. 261 (2020) 618, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110268>.
- [3] C. Coulon, A. Collignon, G. McDonnell, V. Thomas, J. Clin. Microbiol. 48 (2010) 2689–2697, <https://doi.org/10.1128/JCM.00309.10>.
- [4] A. García, P. Goñi, J. Cieloszyk, M.T. Fernandez, L. Calvo-Beguería, E. Rubio, M. F. Fillat, M.L. Peleato, A. Clavel, Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 3132–3140, <https://doi.org/10.1021/es400160k>.
- [5] G. Greub, D. Raoult, Clin. Microbiol. Rev. 17 (2004) 413–433, <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413.2004>.
- [6] R. Mosteo, M.P. Ormad, P. Goñi, J. Rodríguez-Chueca, A. García, A. Clavel, Water Sci. Technol. 68 (2013) 575–583, <https://doi.org/10.2166/wst.2013.201>.
- [7] V. Thomas, G. McDonnell, S.P. Denyer, J.Y. Maillard, FEMS Microbiol. Rev. 34 (2010) 231–259, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x>.
- [8] M.T. Fernández, Molecular characterization of Free Living Amoebae and identification of other parasites from the water network of Zaragoza district: association with other microorganisms and risks for Public Health, University of Zaragoza, Zaragoza (Spain), 2014. ISSN 2254-7606.
- [9] P. Muchesa, M. Leliefs, L. Jurzik, T.G. Bernard, C. Bartie, Free-living amoebae and associated drug resistant bacteria in surface waters: a public health concern? in: H. Mehlhorn, S. Klimpel (Eds.), Parasite and Disease Spread by Major Rivers on Earth. Parasitology Research Monographs, vol 12 Springer, Cham, Switzerland, 2019, pp. 221–236, https://doi.org/10.1007/978-3-030-29061-0_9.
- [10] L. Alcázar-Sanz, B.M. Gawlik. Water Reuse in Europe. Relevant Guidelines, Needs for and Barriers to Innovation, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2014, <https://doi.org/10.2788/29234>. ISBN 978 92 79 44399 2.
- [11] United Nations General Assembly, Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development, 21 October 2015, A/RES/70/1. <https://www.refworld.org/docid/57b6e3e4.html>
- [12] P. Goñi, M.T. Fernández, E. Rubio, Environ. Microbiol. 16 (2014) 339–349, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12363>.
- [13] V. Thomas, Sensitivity and Resistance of Protozoa to Microbicides, in: A.P. Russell, J.Y. Fraissé, S.A. Sartar Maillard (Eds.), Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, Blackwell Publishing Ltd, Hoboken, New Jersey (USA), 2013, pp. 155–177, <https://doi.org/10.1002/9781118425831.ch8>.
- [14] S.S.N. Kolar, J.C. Manarang, A.R. Burns, W.L. Miller, A.M. McDermott, J.P. G. Bergmann, Cont. Lens Anterior Eye 38 (2015) 442–450, <https://doi.org/10.1016/j.clae.2015.06.006>.
- [15] K.J. Silva, L.P. Sagobal-Paz, Water Supply 22 (2022) 8527, <https://doi.org/10.2166/ws.2022.384>.
- [16] B. Casini, F. Aquino, M. Totaro, M. Miccoli, I. Galli, L. Manfredini, C. Giustarini, A. L. Costa, B. Tuvo, P. Valentini, G. Privitera, A. Baggiani, Pathogens 6 (2017) 15, <https://doi.org/10.3390/pathogens6020015>.
- [17] N. Pichel, M. Vivar, M. Fuentes, Chemosphere 218 (2019) 1014–1030, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.205>.
- [18] Y. Penru, A.-R. Guastalli, S. Esplugas, S. Baig, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 233 (2012) 40–45, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.02.017>.
- [19] J. Lommen, S. Kilvington, S.C. Kehoe, F. Al-Touati, K.G. McGuigan, Water Res 39 (2005) 877–883, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.023>.
- [20] H. Manane, H. Shemer, K.G. Linden, J. Hazard. Mater. 146 (2007) 479–486, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.050>.
- [21] S. Aguilár, D. Rosado, J. Moreno Andres, L. Cartuche, D. Cruz, A. Acevedo Merino, E. Nebot, Catal. Today 313 (2018) 94–99, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.045>.
- [22] N.F.F. Moreira, C. Narciso-da-Rocha, M.I. Polo-López, L.M. Pastraus-Martínez, J. L. Faria, C.M. Manaia, P. Fernández-Ibáñez, O.C. Nunes, A.M.T. Silva, Water Res 135 (2018) 195–206, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.064>.
- [23] M. Adcol, V. Granata, G. Carapella, L. Rizzo, J. Hazard. Mater. 465 (2024) 133102, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133102>.
- [24] M.I. Polo-López, M. Castro-Alfárez, S. Nahim Granados, S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, Catal. Today 287 (2017) 15–21, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.10.029>.
- [25] A. Martínez García, S. Nahim Granados, I. Berruti, I. Oller, M.I. Polo-López, J. Environ. Chem. Eng. 11 (2023) 111145, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111145>.
- [26] M. Agulló-Barceló, M.I. Polo-López, F. Lucena, J. Jofre, P. Fernández-Ibáñez, Appl. Catal. B 136–137 (2013) 341–350, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.01.069>.
- [27] C. Sichel, P. Fernandez Ibanez, M. de Carac, J. Tello, Water Res 43 (2009) 1841–1850, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.017>.
- [28] M.I. Polo-López, I. García-Fernández, I. Oller, P. Fernández-Ibáñez, Photochem. Photobiol. Sci. 10 (2011) 381–388, <https://doi.org/10.1039/c0pp00174k>.
- [29] I. García-Fernández, M.I. Polo-López, I. Oller, P. Fernández-Ibáñez, Appl. Catal. B 121–122 (2012) 20–29, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.03.012>.
- [30] S.G. Michael, I. Michael-Kordatou, S. Nahim-Granados, M.I. Polo-López, J. Rochad, A.B. Martínez Piernas, P. Fernández Ibáñez, A. Agüera, C.M. Manaia, D. Fatta Kassinos, Chem. Eng. J. 388 (2020) 124383, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124383>.
- [31] B.J.M. Chauque, M.B. Rott, J. Water Health 19 (2021) 190–202, <https://doi.org/10.2166/wh.2020.401>.
- [32] C. Adan, A. Magnet, S. Fenoy, C. Pablos, C. Águila, J. Marugán, Water Res 144 (2018) 512–521, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.060>.
- [33] L. Wang, Y. Mai, S. Li, L. Shu, J. Fang, Water Res 242 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120288>.
- [34] A. Ortilles, P. Goñi, E. Rubio, M. Sierra, E. Gámez, M.T. Fernandez, M. Benito, M. B. Cristóbal, B. Calvo, Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 58 (2017) 1218–1227, <https://doi.org/10.1167/jov.16-21100>.
- [35] J.M. Schroeder, G.C. Booton, J. Hay, I.A. Niszl, D.V. Seal, M.B. Markus, P.A. Fuerst, T.J. Byers, J. Clin. Microbiol. 39 (2001) 1903–1911, <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001>.
- [36] M. Dupuy, S. Mazouza, F. Berne, C. Bodet, N. Garrec, P. Herbelin, et al., Water Res 45 (2011) 1087–1094, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.025>.
- [37] C. Menacho, P. Chueca, P. Goñi, M.P. Ormad, Bacteria survival after free living amoebae inactivation by the use of common disinfection water treatments, in: International Water Association (Eds.), 3rd International Conference on Disinfection and DBPs Book of Abstract, Milan (Italy), 2022, pp. 132–135.
- [38] R.F.P. Nogueira, M.C. Oliveira, W.C. Paterlini, Talanta 66 (2005) 86–91, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.10.001>.
- [39] United States Environmental Protection Agency, Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual, Office of Water, Washington D.C., 1999. EPA 815 R 99-014. <https://www.epa.gov/>
- [40] W.A.M. Hijnen, E.F. Beerendonk, G.J. Medema, Water Res 40 (2006) 3–22, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030>.
- [41] T.K. Beattie, D.V. Seal, A. Tomlinson, A.K. McFadyen, A.M. Grimason, J. Clin. Microbiol. 41 (2003) 992–3000, <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2992-3000.2003>.
- [42] K.J. Silva, and L.P. Sagobal-Paz, Water Air Soil Pollut. 232 (2021) 483, <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05434-3>.
- [43] S. Giannakis, M.I. Polo, D. Spuhler, J.A. Sánchez, P. Fernández, C. Pulgarin, Appl. Cat. B Environ. 199 (2016) 199–223, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.06.009>.
- [44] W. Khunkitt, D. Lloyd, J.R. Furr, A.D. Russell, J. Infect. 36 (1998) 43–48.
- [45] M. Garajová, M. Mrva, N. Vaskovicová, M. Martinik, J. Melicherová, A. Valigrová, Sci 634 (2019), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>.
- [46] K. Hiti, J. Walochnik, C. Faschinger, E.M. Haller Schober, H. Aspöck, Eye 19 (2005) 1301–1305, <https://doi.org/10.1038/sj.eyc.6701752>.
- [47] Z. He, L. Wang, Y. Ge, S. Zhang, Y. Tian, X. Yang, L. Shu, J. Hazard. Mater. 417 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126006>.
- [48] A.N. Mohammed, Environ. Monit. Assess. 188 (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5147-0>.
- [49] M.T. García, S. Jones, C. Pelaz, R.D. Millar, Y. Abu Kwaik, Y. Environ. Microbiol. 9 (2007) 1267–1272, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01245.x>.
- [50] S. Malato, P. Fernandez-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blauco, W. Genjakk, Catal. Today 147 (2009) 1–59, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>.
- [51] A. Woyda-Ploszczyca, A. Koziel, N. Antos-Krzeminska, W. Jarnuszkievicz, J. Biocentr. Biomembr. 43 (2011) 217–225, <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9351-x>.
- [52] European Union, Hydrogen peroxide as included in the Union list of approved active substances, in: Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, European Parliament and Council of the European Union, Brussels, 2020. <https://www.echa.europa.eu>
- [53] European Union, Hydrogen peroxide as included in the Union list of approved active substances, in: Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, European Parliament and Council of the European Union, Brussels, 2020. <https://echa.europa.eu>
- [54] W. Heaselgrave, S. Kilvington, Acta Trop. 119 (2011) 138–143, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.004>.
- [55] G. Maniakova, I. Salmerón, S. Nahim Granados, S. Malato, I. Oller, L. Rizzo, M. I. Polo-López, Sci. Total Environ. 787 (2021) 147531, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147531>.
- [56] A. García-Gil, L. Feng, J. Moreno-SanSegundo, S. Giannakis, C. Pulgarin, J. Marugán, Chem. Eng. J. 439 (2022) 135709, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135709>.
- [57] M. Lanao, M.P. Ormad, P. Goñi, N. Miguel, R. Mosteo, J.L. Ovelheiro, Sol. Energy 84 (2010) 703–709, <https://doi.org/10.1016/j.solener.2010.01.023>.
- [58] M.I. Abledo-Lameiro, A. Rehoredo-Fernández, M.I. Polo-López, P. Fernández-Ibáñez, E. Ares-Mazas, H. Gómez-Couso, Catal. Today 280 (2016) 132–138, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.05.046>.
- [59] R. Dey, E. Dlusskay, N.J. Ashbolt, J. Water Health 20 (2022) 83, <https://doi.org/10.2166/wh.2021.167>, 2022.

