

**Estudio preliminar para la mejora del conocimiento
sobre la presencia de contaminantes emergentes
y comunidades bacterianas
con resistencias a antibióticos
en las zonas de Red Natura 2000 del eje del Tajo
perteneciente a Castilla-La Mancha**

Abril 2023



Cátedra del
t.a
Lo

UCLM

Universidad de
Castilla-La Mancha

Fundación
SOLISS



INFORME FINAL CONTRATO DE I+D

**ENTRE LA DIRECCIÓN GENERAL DE MEDIO NATURAL Y BIODIVERSIDAD Y LA PROFESORA D^a.
BEATRIZ LARRAZ IRIBAS PARA LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE TÍTULO**

*“ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA MEJORA DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA PRESENCIA DE
CONTAMINANTES EMERGENTES Y DE COMUNIDADES BACTERIANAS CON RESISTENCIA
A ANTIBIÓTICOS EN LAS ZONAS RED NATURA 2000 DEL EJE DEL TAJO EN CASTILLA-LA
MANCHA EN UN CONTEXTO EUROPEO”*

**Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios, María de los Llanos Palop Herreros,
Susana Seseña Prieto, Francisco Javier Guzmán Bernardo, Nuria Rodríguez Fariñas,
María Jiménez Moreno, María Rodríguez Pérez, Raúl Urquiaga Cela, Cristina de los
Reyes Ramos, Beatriz Larraz Iribas.**

Cátedra del Tajo UCLM-Soliss, Universidad de Castilla-La Mancha

28 de abril de 2023



Estudio preliminar para la mejora del conocimiento sobre la presencia de contaminantes emergentes y comunidades bacterianas con resistencias a antibióticos en las zonas de Red Natura 2000 del eje del Tajo perteneciente a Castilla-La Mancha

Índice:

1.	Antecedentes	6
2.	Sitios de muestreo.....	7
3.	Material y métodos	9
3.1.	Toma de muestra	9
3.2.	Caracterización físico-química	9
3.3.	Contaminantes emergentes.....	11
3.4.	Caracterización microbiológica	11
3.4.1.	Recuento de microorganismos y bacterias resistentes a antibióticos.....	11
3.4.1.1.	Medios de cultivo	11
3.4.1.2.	Análisis microbiológico.....	12
3.4.1.3.	Incubación	12
3.4.1.4.	Recuentos microbiológicos y cálculo del porcentaje de bacterias resistentes	12
3.4.1.5.	Aislamiento y purificación de bacterias	13
3.4.2.	Genes de resistencia	13
3.4.2.1.	Extracción y cuantificación de ADN.....	13
3.4.2.2.	RT-qPCR.....	13
3.4.2.3.	Condiciones utilizadas en la q-PCR.....	14
4.	Resultados	14
4.1.	Caracterización físico-química	14
4.2.	Contaminantes emergentes.....	16
4.3.	Caracterización microbiológica	17
4.3.1.	Recuento de microorganismos y de bacterias resistentes a antibióticos.....	17
4.3.2.	Genes de resistencia	19
5.	Discusión	19
5.1.	Caracterización físico-química	19
5.2.	Contaminantes emergentes.....	22
5.3.	Caracterización microbiológica	27



5.3.1.	Recuento de microorganismos y bacterias resistentes a antibióticos.....	27
5.3.2.	Genes de resistencia	29
6.	Conclusiones.....	30
7.	Futuras investigaciones.....	31
8.	Referencias.....	33
Anexo	39





Estudio preliminar para la mejora del conocimiento sobre la presencia de contaminantes emergentes y comunidades bacterianas con resistencias a antibióticos en las zonas de Red Natura 2000 del eje del Tajo perteneciente a Castilla-La Mancha

Abril 2023

1. Antecedentes

La contaminación del medio acuático es un grave problema a nivel mundial y, en consecuencia, existe legislación reguladora específica sobre sustancias actualmente identificadas como contaminantes (Real Decreto 817/2015; Decisión 2455/2001/EC; Directiva 2013/39/UE, entre otras). Sin embargo, esta no es una lista cerrada y existe un grupo de compuestos, denominado contaminantes emergentes (CEs), que todavía no están regulados, pero sobre los que existen motivos de preocupación que hacen necesario vigilarlos y evaluar el peligro potencial asociado (ECHA, 2023; Decisión 2022/1307/UE).

Estos CEs incluyen fármacos (antibióticos, disruptores endocrinos, etc.), cosméticos, productos de cuidado personal, agentes biológicos, compuestos orgánicos persistentes y/o pesticidas; cuyas principales fuentes de emisión a los ríos son las actividades antropogénicas (uso doméstico o actividad industrial, agrícola y ganadera) (Geissen *et al.*, 2015; Morin-Crini *et al.*, 2022; USEPA, 2012).

Dentro de los CEs, un grupo de especial interés es el de los antibióticos ya que, como consecuencia de un uso excesivo y en ocasiones indebido de los mismos, en los últimos años se ha observado un aumento de la resistencia (ARB de “*Antibiotic-Resistance Bacteria*”) y multiresistencia bacteriana a estos compuestos farmacológicos causada por la aparición y el intercambio de genes de resistencia (ARG de “*Antibiotic-Resistance Genes*”) en el medio ambiente (Grenni, 2022; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014).

La aparición de resistencias entre bacterias patógenas es motivo de especial preocupación desde el punto de vista sanitario, de hecho ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales amenazas a la salud pública a la que nos enfrentamos a nivel global y es coherente con su inclusión en el plan de acción europeo “Una sola salud” (Comunicación 2017/339), que pretende luchar frente a la resistencia a estos compuestos mejorando el conocimiento sobre su aparición y propagación en el medio ambiente (<https://www.onehealthcommission.org/>).

Además, la presencia de CEs (en especial los antibióticos) y la aparición de bacterias y genes de resistencia a antibióticos en el medio ambiente se relaciona con la pérdida de biodiversidad. A este respecto, son de particular relevancia los espacios protegidos, por la gravedad de las consecuencias que este tipo de problemas puede tener en los mismos. A escala europea destacan por su importancia los espacios naturales protegidos incluidos en la Red Natura 2000 (RN2000) (Directiva 92/43/CEE y Directiva 2009/147/CE), una red que se encarga de garantizar la supervivencia a largo plazo de las especies y los hábitats más valiosos y amenazados de Europa.

En la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha existen espacios naturales protegidos dentro de RN2000 (DGAPFYEN, 2018) situados en el tramo medio de la cuenca del río Tajo que son especialmente sensibles a esta problemática debido a las importantes presiones de contaminación que soportan. Sin embargo, una exhaustiva revisión bibliográfica ha puesto de manifiesto la falta de información al respecto. Siendo este el marco y el contexto del presente informe, en el que se ha realizado una primera aproximación a esta problemática estableciendo una red de muestreo en zonas RN2000 en el tramo medio del río Tajo y realizando un estudio de la presencia de CEs, con especial interés en los antibióticos, y de bacterias resistentes y genes de resistencia asociados. Debido a la duración de este proyecto, sólo se ha podido abordar un muestreo, realizado en verano de 2022, por lo que teniendo en cuenta la variabilidad asociada en este tipo de estudios los resultados deberán ser considerados como preliminares.

2. Sitios de muestreo

Para la selección de los puntos de muestreo en espacios RN2000 del tramo medio del río Tajo se han tenido en cuenta las presiones y otros aspectos relevantes, tales como explotaciones ganaderas y agrícolas, industrias farmacéuticas y EDARs próximas a este tramo del río.

En total, se seleccionaron 11 puntos de muestreo en dirección este-oeste desde el Alto Tajo en la zona de Almaguera (Guadalajara) hasta Talavera de la Reina (Toledo). En la Figura 1 se presentan las estaciones de muestreo, y en tonalidades verdes y naranjas las zonas y espacios RN2000 que comprenden el transcurso del tramo medio del río Tajo. La Tabla 1 recoge información sobre todas las zonas de muestreo con las coordenadas, detalle de la zona y el nombre del espacio RN2000 del que forman parte.

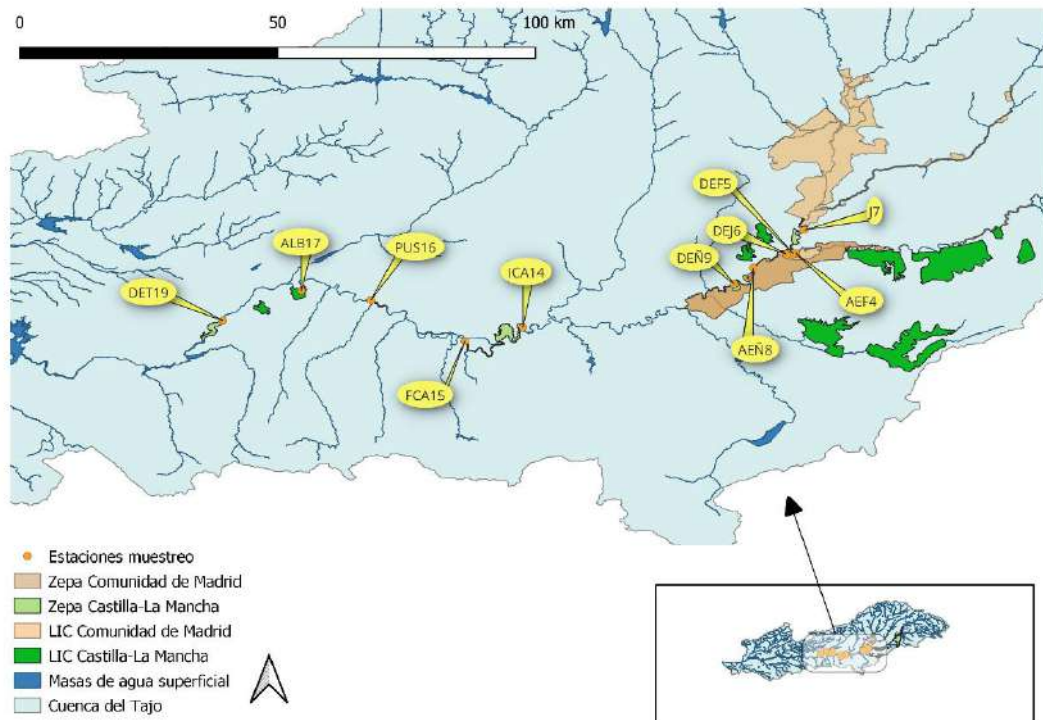


Figura 1. Puntos de muestreo seleccionados y zonas RN2000 en el tramo medio del río Tajo.



Tabla 1. Datos sobre los puntos de muestreo. Coordenadas, ubicación y detalles de la zona (presencia de explotaciones ganaderas colindantes, Red Natura, EDARs, farmacéuticas y/o estaciones CEMAS).

Puntos	Coordenadas		Detalles	RN 2000
<i>AEF4</i>	40.033133	-3.626305	Antes de la farmacéutica Ercross. Aranjuez	Vegas, Cuestas y Páramos del Sueste de Madrid (ES3110006)
<i>DEF5</i>	40.031304	-3.632347	Después de la farmacéutica Ercross y antes EDAR de Aranjuez	
<i>DEJ6</i>	40.031390	-3.647276	Después de la EDAR de Aranjuez	
<i>J7</i>	40.086778	-3.607168	Control Jarama. Puente largo	
<i>AEÑ8</i>	39.9999505	-3.72294865	Antes de la EDAR de Añover de Tajo. Estación CEMAS cercana	Vegas, Cuestas y Páramos del Sueste de Madrid (ES3110006) y Carrizales y Sotos del Jarama y Tajo (ES0000438)
<i>DEÑ9</i>	39.963.909	-3.766.270	Después de la EDAR de Añover de Tajo	
<i>ICA14</i>	39.866991	-4.243206	Embalse de Castrejón (Burujón). Colindante con una finca ganadera	Río Tajo en Castrejón, Islas de Malpica de Tajo y Azután (ES0000169)
<i>FCA15</i>	39.8348089	-4.37145317	Cercano a un matadero (La Puebla de Montalbán)	
<i>PUS16</i>	39.927195	-4.582063	Desembocadura del río Pusa. Estación CEMAS cercana (Bernuy)	
<i>ALB17</i>	39.968785	-4.744228	Antes de la desembocadura del río Alberche	Barrancas de Talavera (ES4250003)
<i>DET19</i>	39.884777	-4.914666	Después de la EDAR de Talavera de la Reina	Río Tajo en Castrejón, Islas de Malpica de Tajo y Azután (ES0000169)

3. Material y métodos

3.1. Toma de muestra

Las muestras fueron recogidas durante el verano del año 2022, todos los lunes comprendidos entre el día 27 de junio y el 18 de julio. Finalmente, dos de los puntos seleccionados (DEJ6 y ALB17) no pudieron ser muestreados por problemas de accesibilidad. Por tanto, en total se tomaron 9 muestras.

La toma de muestra se realizó utilizando un dispositivo (pértiga) (Figura 2) que permite recoger el agua a una cierta distancia de la orilla del río. Las muestras que iban a ser destinadas a análisis químico se recogieron en botellas de vidrio color topacio (250, 500 y 1000 mL) que previamente habían sido lavadas con HNO_3 y HCl y agua ultrapura. Mientras que la muestra destinada al análisis microbiológico y molecular se tomó en botella de polietileno (2 L) previamente esterilizada en autoclave.



Figura 2. Ejemplo de recogida de muestra con pértiga (Punto de muestreo DET19).

A las muestras que iban a ser destinadas al análisis de metales se les adicionó 1% de HNO_3 como conservante. No siendo necesario en el resto de las determinaciones.

Las muestras fueron conservadas 4°C durante el transporte y en el laboratorio hasta su posterior análisis.

3.2. Caracterización físico-química

Los parámetros físico-químicos analizados se presentan clasificados basándose en el intervalo de concentración en el que se encuentran y la especificidad de su determinación. En la Tabla 2 se detalla la metodología analítica y la unidad de medida de cada uno.



Tabla 2. Parámetros físico-químicos analizados y métodos utilizados.

Parámetros	Método	Unidad
Parámetros no específicos		
<i>pH</i>	Potenciometría directa	
<i>Temperatura</i>	Sonda de temperatura	°C
<i>Conductividad</i>	Conductimetría	mS/cm
<i>Sólidos disueltos</i>	Gravimetría	mg/L
<i>Sólidos en suspensión</i>		mg/L
Componentes mayoritarios		
<i>Calcio</i>	Volumetría	mg/L
<i>Magnesio</i>	Espectroscopía de absorción atómica	mg/L
<i>Sodio</i>	Espectroscopía de emisión atómica	mg/L
<i>Potasio</i>	Espectroscopía de emisión atómica	mg/L
<i>Cloruros</i>	Potenciometría	mg/L
Parámetros relacionados con la materia orgánica y el estado trófico		
<i>Nitritos</i>	Espectrofotometría de absorción molecular UV-visible	µg/L
<i>Amonio</i>		µg/L
<i>Fosfatos</i>		mg/L
<i>Clorofila a</i>		µg/L
<i>Nitratos</i>	Potenciometría	mg/L
<i>Oxidabilidad</i>	Volumetría	mg/L O ₂
Elementos traza		
<i>Aluminio</i>	ICP-MS	µg/L
<i>Arsénico</i>		µg/L
<i>Boro</i>		µg/L
<i>Bario</i>		µg/L
<i>Cadmio</i>		µg/L
<i>Cobalto</i>		µg/L
<i>Cromo</i>		µg/L
<i>Cobre</i>		µg/L
<i>Hierro</i>		µg/L
<i>Manganeso</i>		µg/L
<i>Mercurio</i>		µg/L
<i>Molibdeno</i>		µg/L
<i>Níquel</i>		µg/L
<i>Plomo</i>		µg/L
<i>Antimonio</i>		µg/L
<i>Selenio</i>		µg/L
<i>Silicio</i>		µg/L
<i>Uranio</i>	µg/L	
Otros parámetros		
<i>Alcalinidad</i>	Volumetría	mg/L CaCO ₃
<i>Fluoruros</i>	Potenciometría	µg/L



3.3. Contaminantes emergentes

El estudio de los CE se realizó de manera no dirigida, es decir, mediante un barrido para identificar los compuestos presentes en el extracto obtenido tras la etapa de extracción en fase sólida. Este barrido se acotó para 80 compuestos de interés farmacéutico de uso común, incluyendo analgésicos/antiinflamatorios, anestésicos, antiarrítmicos, antibióticos, antidepresivos, antiepilépticos/anticonvulsivos, antifúngicos, antihipertensivos, estimulantes y reguladores lipídicos (Anexo, Tabla A1).

La metodología empleada para la determinación de CE consiste en una etapa de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés “*Solid Phase Extraction*”) y posterior análisis mediante cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Las condiciones de extracción están basadas en el método propuesto por Robles-Molina *et al.* (2014). Se utilizaron cartuchos (Oasis HLB 200 mg, 6 mL), los cuales previamente fueron acondicionados con 4 mL de metanol y 8 mL de agua ultrapura. Para el análisis se tomaron alícuotas de 200 mL de las muestras, que se ajustaron a pH 7, se filtraron con filtros de 0,45 μm y se hicieron pasar por los cartuchos a vacío. Posteriormente, se realizó la elución de los analitos adicionando dos alícuotas de 4 mL de metanol. El extracto de 8 mL se evaporó hasta sequedad con una corriente de N_2 y se reconstituyó en 2 mL de metanol.

Tras esto, se realizó el análisis de las muestras mediante cromatografía líquida (Thermo Vanquish Flex UHPLC; Thermo Fisher Scientific) acoplada a espectrometría de masas (Q-Exactive Orbitrap; Thermo Fisher Scientific). La ionización se llevó a cabo en modo positivo y la adquisición y el tratamiento de datos se realizó mediante los programas informáticos Xcalibur 3.0^(R) y Trace Finder 3.0^(R) como se describe en bibliografía (Griffero *et al.*, 2019). La identificación de los compuestos se basó en los siguientes factores y por este orden: tiempo de retención, masa exacta del ion precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$, perfil isotópico y detección de 2 fragmentos característicos en el modo MS-MS (Griffero *et al.*, 2019).

3.4. Caracterización microbiológica

3.4.1. Recuento de microorganismos y bacterias resistentes a antibióticos

3.4.1.1. Medios de cultivo

La determinación de bacterias cultivables resistentes a antibióticos en el agua del río Tajo se realizó según el procedimiento descrito por Sorgen *et al.* (2021).

Como medio para el recuento de bacterias totales se utilizó un medio de crecimiento general como es el agar Triptona Soja (TSA) (Condalab) al que se añadía cicloheximida (100 mg/L), un inhibidor de la síntesis proteica en eucariotas que funciona como antifúngico. Para el recuento de bacterias resistentes a los antibióticos se utilizó el medio anterior al que tras la esterilización se añadía, por separado, un volumen de una solución de cada uno de los antibióticos siguientes, previamente esterilizada por filtración, para alcanzar en el medio las concentraciones indicadas: ampicilina (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ciprofloxacina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), doxiciclina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y sulfametoxazol (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Además, se utilizaron otros medios de cultivo: medio R2A de Reasoner (R2A, Pronadisa[®]) adecuado para la recuperación de bacterias ambientales; Agar cromogénico (Agar-m-FC, Microinstant[®]) para recuento de coliformes; un medio selectivo para el crecimiento de

Acinetobacter spp (CHORMagar™) y el agar Rosa de Bengala (Scharlau), para el recuento de hongos filamentosos, un medio que lleva el antibiótico cloranfenicol para impedir el crecimiento de las bacterias.

3.4.1.2. *Análisis microbiológico*

Para el análisis microbiológico se utilizó el método de filtración. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de agua en suero fisiológico estéril (NaCl, 9,5 g/L) y, a continuación, se filtraban 100 mL de cada dilución, utilizando filtros Whatman (Sigma®, Madrid) de 47 mm de diámetro y tamaño de poro de 0,45 µm. Finalizada la filtración, los filtros se colocaban en la superficie de los medios contenidos en las placas. Las diluciones se sembraron por duplicado en todos los medios indicados anteriormente. En la Figura 3, se muestra el equipo de filtración utilizado.



Figura 3. Equipo de filtración.

3.4.1.3. *Incubación*

Las placas de los medios TSA, R2A y aquellas del medio para *Acinetobacter* se incubaron a 30°C durante 48 horas y aquellas de agar cromogénico para el crecimiento de coliformes se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para el crecimiento de hongos filamentosos, las placas de agar Rosa de Bengala se incubaron a 25°C en un ambiente húmedo durante 5 días. En todos los casos, la incubación se realizó en aerobiosis. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedía al recuento de las colonias crecidas en las placas.

3.4.1.4. *Recuentos microbiológicos y cálculo del porcentaje de bacterias resistentes*

Para los recuentos se utilizó un contador manual como el mostrado en la Figura 4 y los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 mL de agua (UFC/100 mL).





Figura 4. Contador de colonias.

A partir de los recuentos, se calcularon los % de bacterias resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados, tomando como referencia los recuentos obtenidos en el medio TSA con cicloheximida, según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de bacterias resistentes} = \frac{\text{Recuento (UFC/mL) en medio TSA con antibiótico}}{\text{Recuento (UFC/mL) en medio TSA}} \times 100$$

El porcentaje total de resistencia para cada punto de muestreo se calculó como el sumatorio de los porcentajes obtenidos para cada uno de los antibióticos.

3.4.1.5. Aislamiento y purificación de bacterias

De las placas utilizadas en los recuentos, se picaron un número de colonias representativas de todas las morfologías encontradas, que fueron purificadas, por resiembra en placas de agar TSA, y que se mantienen conservadas en congelación (-80°C), hasta que puedan ser genotipadas e identificadas.

3.4.2. Genes de resistencia

Para la determinación de los genes de resistencia, se filtraron 200 mL de las muestras de agua a través de filtros Whatman (Sigma, Madrid) que se conservaron a -80°C hasta la extracción del ADN.

3.4.2.1. Extracción y cuantificación de ADN

El filtro fue transferido a un tubo Falcon™ de 50 mL, donde se adicionó 1 mL de H₂O destilada. Tras una centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos, se procedió a la extracción del ADN utilizando el kit comercial “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Quiagen, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez obtenido el ADN, se determinó su concentración y pureza, por medida de la absorbancia a 260 nm y la relación 260/280, respectivamente, en un “NanoDrop Biotek” (Synergy HT).

3.4.2.2. RT-qPCR

Para la determinación de las bacterias totales en las muestras de agua, se realizó una qPCR absoluta utilizando la secuencia del gen *16S*. Seguidamente, se calculó el log₁₀ del número de copias de cada gen a partir del Ct obtenido. Por otra parte, se realizó una qPCR relativa para detectar la presencia de genes relacionados con resistencias bacterianas a diferentes antibióticos.

Los experimentos se llevaron a cabo con un equipo ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el software Applied Biosystems, empleándose para la amplificación el reactivo SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), que incluía 10 pmoles de los cebadores correspondientes (Anexo, Tabla A2) suministrados por la empresa Sigma Aldrich.

Se han analizado genes que codifican para la resistencia a las tetraciclinas (*tetA*, *tetB*) (antibiótico de referencia: doxiciclina); sulfonamidas (*sul1*, *sul2*) (antibiótico de referencia: sulfametoxazol); fluoroquinolonas (*qnrB*, *qnrS*, *qnrA*) (antibiótico de referencia: ciprofloxacina); β-lactamasas de bacterias gram negativas (*blaTEM*) (antibiótico de referencia: ampicilina); antibióticos carbapenémicos de última generación (*blaKPC*); vancomicina (*vanA*); colistina (*mcr*-



1) y metilina (*mecA*), así como la presencia del integrón responsable de la acumulación y diseminación de casetes que contienen genes de resistencia a cefalosporinas, carbapenémicos y quinolonas (*int1*). La elección de estos genes de resistencia se hizo atendiendo a su prevalencia y facilidad de transferencia, además de por su relevancia clínica y medioambiental (Amato *et al.*, 2021).

3.4.2.3. Condiciones utilizadas en la q-PCR

Se ha estudiado la presencia de los diferentes genes en cada una de las 9 muestras de agua por duplicado. Las condiciones utilizadas en la reacción de PCR fueron las siguientes: un ciclo a 50 °C durante 2 minutos; un ciclo a 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos cada uno de ellos con dos etapas, una a 95 °C durante 15 segundos seguida de un calentamiento a la temperatura de anillamiento correspondiente (Tabla 3) durante 1 minuto.

Tabla 3. Temperatura de anillamiento utilizada para la qPCR.

Genes estudiados	Temperatura (°C)
<i>blaKPC, mcr-1</i>	54
<i>tetB, tetC, sul1, sul2, qnrA</i>	55
<i>16S, mecA, blaTEM, int1, vanA</i>	60
<i>qnrB, qnrS</i>	62

4. Resultados

4.1. Caracterización físico-química

Se ha realizado en primer lugar una caracterización físico-química general de las muestras de agua. Los parámetros se han categorizado en cinco grupos en función de la concentración en la que se suele encontrar en aguas de ríos y la especificidad de su determinación. Los resultados se muestran en las Tablas 4 (parámetros no específicos), 5 (componentes mayoritarios), 6 (parámetros relacionados con la materia orgánica y el estado trófico) y 7 (otros parámetros). Los resultados del análisis de metales se muestran en la Tabla A3 en el Anexo.

Tabla 4. Resultados de **parámetros no específicos**. Los valores de los sólidos en suspensión, disolución y totales están expresados como concentración media (mg/L) ± SD de dos replicados.

Muestra	pH*	Temperatura (°C)*	Conductividad (μS/cm)*	Sólidos en suspensión	Sólidos en disolución	Sólidos totales
AEF4	7,83	26,0	1455	36,0 ± 2,8	1176,5 ± 7,8	1212,5 ± 5,0
DEF5	7,7	26,4	1460	31,5 ± 5,0	820 ± 71	852 ± 76
J7	7,49	23,9	2131	94,5 ± 6,4	1393 ± 188	1488 ± 182
AEÑ8	7,76	25,4	1794	21,5 ± 5,0	1319,0 ± 7,1	1340,5 ± 2,1
DEÑ9	7,7	25,6	1848	38,0 ± 8,5	1341,0 ± 4,2	1379,0 ± 13
ICA14	7,84	27,2	2386	88 ± 23	1541 ± 172	1629 ± 195
FCA15	7,72	25,0	1951	91,0 ± 1,4	1202 ± 98	1293 ± 96
PUS16	8,07	27,9	1981	10,5 ± 2,1	1397 ± 19	1407 ± 21
DET19	8,65	28,3	1920	32,0 ± 2,8	1276 ± 117	1308 ± 114

*Parámetros medidos *in situ* por una sonda.



Tabla 5. Resultados de **compuestos mayoritarios**. Los valores están expresados como concentración media (mg/L) \pm SD de dos replicados.

Muestra	Calcio	Magnesio	Sodio	Potasio	Cloruros
AEF4	176,8 \pm 1,1	54,33 \pm 0,85	110,69 \pm 0,77	3,036 \pm 0,078	92,9 \pm 2,6
DEF5	181,2 \pm 1,7	55,62 \pm 0,33	98 \pm 12	4,057 \pm 0,031	101,0 \pm 3,0
J7	224,8 \pm 1,1	43 \pm 15	171 \pm 10	16,15 \pm 0,21	264,8 \pm 7,9
AEÑ8	207,6 \pm 1,7	52,30 \pm 0,20	122 \pm 17	8,152 \pm 0,016	193 \pm 11
DEÑ9	206,4 \pm 2,3	54,10 \pm 0,39	74,4 \pm 4,6	9,18 \pm 0,42	181,6 \pm 5,4
ICA14	203,2 \pm 1,1	71,8 \pm 1,4	151,5 \pm 2,3	10,22 \pm 0,25	214,7 \pm 6,4
FCA15	179,6 \pm 1,7	66,75 \pm 0,39	102,5 \pm 1,9	10,848 \pm 0,058	185,4 \pm 5,5
PUS16	174,00 \pm 0,57	68,1 \pm 1,0	109,0 \pm 2,7	11,25 \pm 0,31	160,1 \pm 4,7
DET19	164,80 \pm 1,1	61,1 \pm 1,1	105,17 \pm 0,38	10,477 \pm 0,078	181,6 \pm 5,4

Tabla 6. Resultados de **parámetros relacionados con materia orgánica y estado trófico**. Los valores están expresados como concentración media \pm SD de dos replicados.

Muestra	NO ₂ ⁻ (μ g/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (μ g/L)	Cla (μ g/L)	Oxidabilidad (mg/L O ₂)
AEF4	88,1 \pm 4,1	28,2 \pm 2,8	<0,040*	719 \pm 20	19,92 \pm 0,65	2,10 \pm 0,14
DEF5	85,5 \pm 4,1	25,0 \pm 2,3	<0,040*	726 \pm 30	50,0 \pm 6,4	1,850 \pm 0,071
J7	3268 \pm 301	129 \pm 14	1,84 \pm 0,12	1150 \pm 30	72,7 \pm 4,6	3,85 \pm 0,21
AEÑ8	664 \pm 17	56,6 \pm 4,1	0,38 \pm 0,22	804 \pm 20	57,9 \pm 8,5	3,05 \pm 0,35
DEÑ9	403,7 \pm 9,3	33,3 \pm 2,7	0,42 \pm 0,16	550 \pm 20	51,9 \pm 6,6	2,85 \pm 0,35
ICA14	241,9 \pm 5,0	44,8 \pm 4,0	1,78 \pm 0,12	352 \pm 20	347,0 \pm 3,3	8,55 \pm 0,21
FCA15	255,2 \pm 5,3	24,3 \pm 2,4	2,15 \pm 0,11	620 \pm 20	90,4 \pm 5,9	6,450 \pm 0,071
PUS16	183,6 \pm 4,0	35,4 \pm 2,5	3,13 \pm 0,10	268 \pm 20	60,23 \pm 8,8	5,350 \pm 0,071
DET19	149,1 \pm 3,8	9,28 \pm 0,67	2,95 \pm 0,10	345 \pm 10	140,9 \pm 3,9	7,30 \pm 0,28

Nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻), fosfatos (PO₄³⁻), amonio (NH₄⁺), clorofila (Cla).

* Concentración correspondiente al límite de cuantificación

Tabla 7. Resultados de **alcalinidad y fluoruros**. Los valores están expresados como concentración media \pm SD de dos replicados.

Muestra	Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)	Fluoruros (μ g/L)
AEF4	178,0 \pm 1,4	300,1 \pm 6,4
DEF5	170,50 \pm 0,71	311,3 \pm 6,6
J7	185,5 \pm 7,8	408 \pm 15
AEÑ8	188,5 \pm 5,0	365 \pm 14
DEÑ9	186,0 \pm 1,4	403,1 \pm 8,5
ICA14	127,5 \pm 3,5	450,2 \pm 9,5
FCA15	155,5 \pm 2,1	444,7 \pm 9,5
PUS16	137,50 \pm 0,71	450,2 \pm 9,5
DET19	148,50 \pm 0,71	418,2 \pm 8,9



4.2. Contaminantes emergentes

La Tabla 8 muestra los CE que han sido detectados, del listado presentado en el Anexo (Tabla A1), en al menos una de las muestras y la concentración en la que se encuentran en ng/L. Se presentan valores medios de tres determinaciones independiente. La desviación estuvo entre el 8 y el 15 % de RSD. Los datos han sido expresados teniendo en cuenta tres cifras significativas.

Tabla 8. Contaminantes emergentes detectados (ng/L). Los valores están expresados como concentración media de tres replicados con un valor de %RSD entre el 8 y el 15 %.

Compuestos	AEF4	DEF5	J7	AEÑ8	DEÑ9	ICA14	FCA15	PUS1	DET19
Analgésicos/Antiinflamatorios									
<i>Antipirina</i>			309	139	131	81,4	99,6	135	122
<i>Paracetamol</i>	27,5								76,4
<i>Tramadol clorhidrato c-iv</i>		2,55	318	133	126	99,7	43,3	58,3	54,6
Anestésicos									
<i>Mepivacaína clorhidrato</i>						3,54			
<i>Lidocaina</i>			57,7	26,0	24,9	15,8	16,1	19,3	15,8
<i>Telmisartan</i>			79,0		64,0	63,5	54,9	77,0	47,3
Antiarrítmicos									
<i>(+)-Flecainida</i>			181	83,8	101	64,8	89,0	77,1	65,5
Antibióticos									
<i>Sulfametoxazol</i>			152	67,1	57,6	30,7	31,7	44,0	42,1
<i>Sulfapiridina</i>			29,8	12,8	10,2			5,58	2,86
<i>Lincomicina</i>								6,90	155
<i>Trimetoprima</i>			22,6	8,03	7,38				
Antidepresivos									
<i>Citalopram hidrobromuro</i>			27,2	18,5	22,0	11,4			
<i>o-desmetilvenlafaxina</i>			322	74,2	66,8	91,2	49,8	20,9	12,5
<i>Venlafaxina clorhidrato</i>	4,91		99,2	38,4	34,8	16,5		8,38	7,64

*Casillas en blanco: por debajo del límite de cuantificación



Tabla 8 (cont.). Contaminantes emergentes detectados (ng/L). Los valores están expresados como concentración media de tres replicados con un valor de %RSD entre el 8 y el 15 %.

Compuestos	AEF4	DEF5	J7	AEÑ8	DEÑ9	ICA14	FCA15	PUS1	DET19
Antiepilépticos/Anticonvulsivos									
<i>Carbamazepina</i>			62,8	30,8	32,4	27,9	29,9	43,4	41,0
<i>10,11-epoxi-carbamazepina</i>			67,8	108	30,4			37,2	28,9
<i>Gabapentina</i>			11,5	4,88	4,91			4,45	4,13
<i>Lamotrigina</i>		4,74	329	138	139	153	170	190	184
Antifúngicos									
<i>Fluconazol</i>			748	290	331	310	352	472	444
Anti-hipertensivos									
<i>Irbesartán</i>			450	141	135	115		18,1	
<i>Teobromina</i>	254		284	260	176			126	245
Estimulantes									
<i>Cotina</i>	11,2		31,2	24,2	22,9	18,1	33,4	34,3	31,4
<i>Teofilina</i>			22,6	16,4	29,4			19,1	17,0
Reguladores lipídicos									
<i>Gemfibrozilo</i>			91,5	33,7	26,0				
TOTAL	297	7,29	3694	1647	1573	1102	970	1397	1595

*Casillas en blanco: por debajo del límite de cuantificación

4.3. Caracterización microbiológica

4.3.1. Recuento de microorganismos y de bacterias resistentes a antibióticos

En las tablas A4 y A5 (Anexo) se recogen los recuentos de bacterias y hongos filamentosos en las aguas de todos los puntos muestreados. Los valores de los recuentos de bacterias totales oscilaron entre 10^4 y 10^6 UFC/100mL, siendo los puntos de muestreo DEF5 e ICA14 los que presentaron el menor (9×10^4 UFC/100mL) y el mayor ($4,35 \times 10^6$ UFC/100mL) recuento, respectivamente.

Los recuentos de los hongos filamentosos fueron, como era de esperar, menores que los obtenidos para las bacterias totales, oscilando entre $4,5 \times 10^1$ UFC/100mL, correspondiente al punto ICA14, y $1,55 \times 10^3$ UFC/100mL, valor obtenido para el punto DET19. Cabe destacar que este comportamiento fue justo el contrario al observado en los recuentos de bacterias totales.

El análisis microbiológico reveló que en todas las muestras de agua analizadas había presencia de *Acinetobacter spp.* y de coliformes totales y, en la mayoría de los puntos de muestreo, se



puso de manifiesto una elevada concentración de *E. coli*, con valores entre 7×10^2 y $1,92 \times 10^4$ UFC/100 mL.

Cabe destacar que los valores de los recuentos de bacterias viables cultivables mostraron una tendencia creciente a lo largo del tramo estudiado, aumentando en algunos casos hasta dos órdenes de magnitud desde el punto AEF4 hasta el DET19.

La Figura 5 muestra los % de bacterias resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados, así como el % total de resistencia, calculado como el sumatorio de los % individuales.

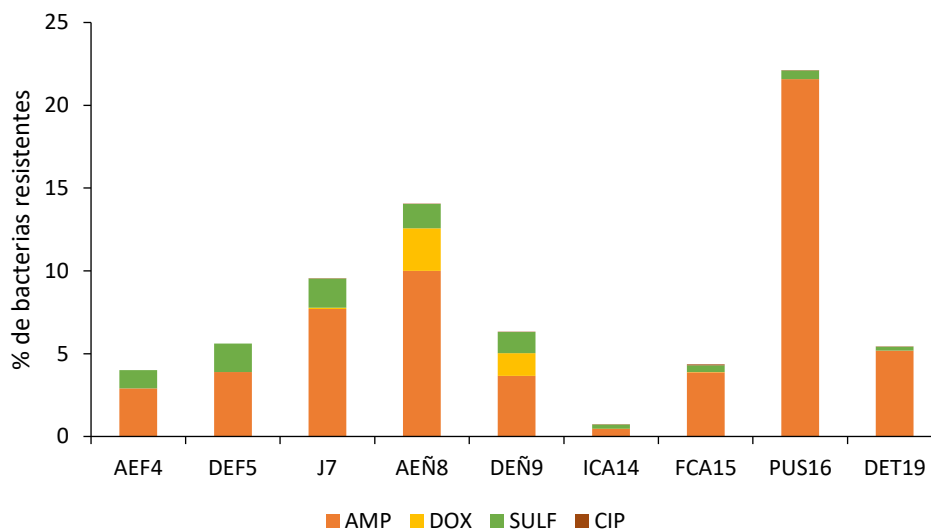


Figura 5. Porcentajes de bacterias resistentes a cada uno de los antibióticos analizados y el porcentaje total de resistencia en cada punto de muestreo. AMP (ampicilina), DOX (doxiciclina), SULF (sulfametoxazol), CIP (ciprofloxacina)

Los porcentajes de resistencia a cada uno de los antibióticos oscilaron entre 0 y 0,0045% para la ciprofloxacina; el 0,23 y el 1,75% para el sulfametoxazol; el 0 y el 2,58% para la doxiciclina y entre el 0,48 y el 21,57% para la ampicilina.

El punto de muestreo en el que se detectó un mayor porcentaje de bacterias resistentes a la ampicilina fue PUS16, mientras que AEÑ8, J7 y FCA15 fueron los que presentaron mayores porcentajes de bacterias resistentes a la doxiciclina, al sulfametoxazol y a la ciprofloxacina, respectivamente. El punto con mayor porcentaje total de resistencia fue PUS16, mientras que el de menor fue el ICA14. Cabe destacar que en los puntos AEF4, DEF5, PUS16 y DET19 solo se detectaron bacterias resistentes a algunos de los antibióticos ensayados, a diferencia de lo ocurrido en los restantes puntos.

De forma general, no se observó ninguna tendencia en cuanto a bacterias resistentes a antibióticos se refiere en el tramo estudiado.

4.3.2. Genes de resistencia

La concentración de ADN en las muestras osciló entre 5,455 y 43,488 ng/ μ L y pudo comprobarse que su pureza, determinada por el valor de la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm, era también la adecuada, por lo que se procedió a realizar el estudio del resistoma.

El gen *16S* codifica para el ARNr (Ácido Ribonucleico ribosomal) de la subunidad pequeña de los ribosomas bacterianos, constituyendo, por tanto, una diana universal para la identificación y cuantificación de bacterias (Rodicio & Mendoza, 2004). La Figura 6 representa el número de copias del gen endógeno *16S* en los diferentes puntos de muestreo.

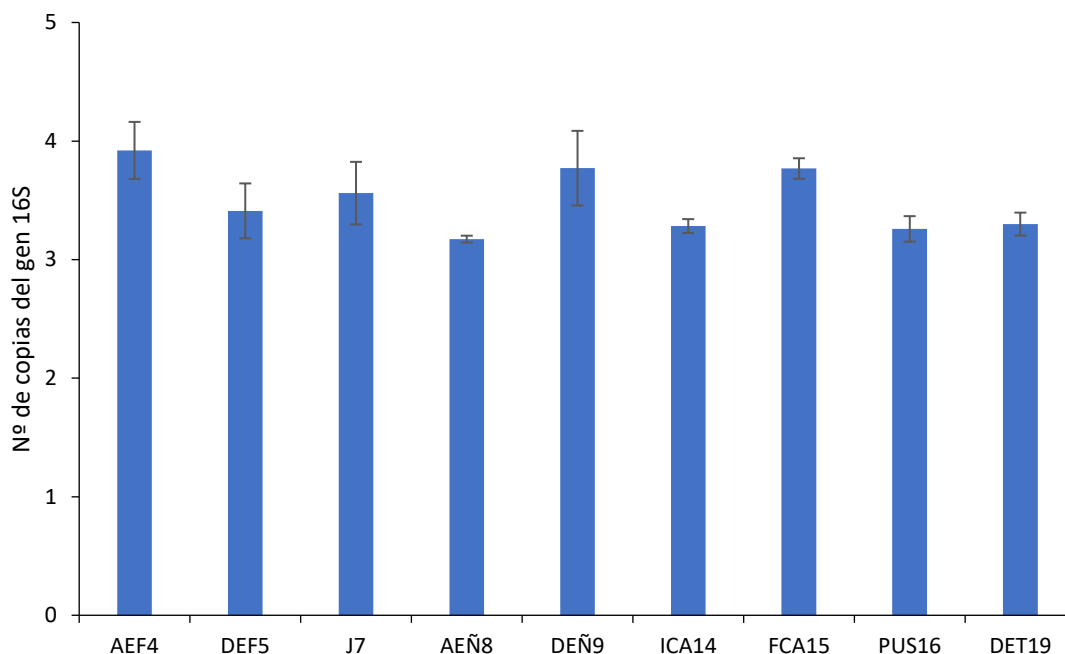


Figura 6. Número de copias del gen *16S* tras el ensayo de qPCR absoluta.

De los 11 genes analizados mediante qPCR, solo se detectó la presencia de los genes *blaTEM*, *sul1*, *sul2* e *int1*. Los genes *blaTEM*, *sul1* e *int1* se encontraron en las aguas de todos los puntos de muestreo, mientras que el gen *sul2* solo se amplificó en la muestra ICA14.

5. Discusión

5.1. Caracterización físico-química

La evaluación del estado de las masas de agua superficiales implica determinar tanto su estado ecológico, relacionado con la calidad de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, como su estado químico (Real Decreto 817/2015). El estado ecológico se clasifica empleando una serie de indicadores específicos de la categoría de masa de agua superficial de que se trate, mientras que para el estado químico se evalúa que las concentraciones de contaminantes no superen los límites establecidos en la correspondiente normativa. Así pues, la evaluación del estado ecológico y químico del río Tajo se ha realizado en base a los parámetros que dicta el Real Decreto 817/2015, el cual establece los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental.



Dentro del Plan Hidrológico para la caracterización de masas de agua del Tajo (CHT, 2022), los puntos AEF4, DEF5 y J7 se clasifican como R-T16, Ejes mediterráneo-continental mineralizados / Artificial o muy modificada; siendo el resto de los puntos de muestreo categorizados como R-T17, Grandes ejes en ambiente mediterráneo / Artificial o muy modificada.

A la hora de categorizar las aguas en función de su **estado ecológico** se han tenido en cuenta indicadores físico- químicos de calidad (pH, amonio, fosfatos y nitratos) y las normas de calidad ambiental (NCA) del Anexo V del RD 817/2015 para sustancias preferentes, no habiéndose considerado indicadores biológicos o hidromorfológicos. Las sustancias preferentes que se han tenido en cuenta son arsénico, cobre, cromo, selenio, zinc y fluoruros. A pesar de que este estudio sólo se ha realizado en un único período de tiempo y la norma expresa que los valores de NCA-MA (MA: media) aplicables deben compararse con la media aritmética de las concentraciones medidas a lo largo del año, se ha realizado una evaluación preliminar de los mismos para determinar en el estado de las aguas que han sido analizadas en base a estas sustancias contaminantes preferentes. Para la evaluación de cobre y zinc, ha sido necesario considerar que los valores de las NCA en aguas superficiales continentales varían en función de la dureza del agua con arreglo a diferentes categorías, pero en todos los casos se han seleccionado los valores de NCA máximos ya que la dureza de las aguas de estudio se encontraba entre 660 y 800 mg/L de CaCO₃ (categoría dureza > 100 mg/L CaCO₃).

Para la clasificación de las aguas se ha seguido el principio de evaluación del estado de las masas de agua en Europa “uno fuera-todos fuera” (*One out, all out*) por lo que en todos los casos se ha adoptado el valor más restrictivo a efectos de clasificación. Para ambos ecotipos y tipo de indicadores considerados la normativa sólo establece dos categorías posibles en cuanto a la calidad físico-química: Muy bueno/bueno (bueno) y bueno/moderado (moderado). Por tanto, se tomará como resultado bueno aquella muestra que cumpla con los valores de referencia establecidos en el RD 817/2015 y, en caso contrario, se clasificará el estado ecológico como moderado.

En la Tabla 9, se presenta la valoración del estado ecológico realizada en base a los parámetros físico-químicos. Por otro lado, en la Tabla 10, se indican los parámetros que han resultado no conformes para cada una de las muestras.

Tabla 9. Resultados de la valoración físico-química para el estado ecológico.

Muestras	Clase de calidad físico-química
AEF4	Moderado
DEF5	Moderado
J7	Moderado
AEÑ8	Moderado
DEÑ9	Moderado
ICA14	Moderado
FCA15	Moderado
PUS16	Moderado
DET19	Moderado



Tabla 10. Parámetros que se encuentran fuera de la conformidad.

Muestras	Parámetros no conformes
AEF4	Nitratos, selenio
DEF5	Nitratos, selenio
J7	Amonio, fosfatos, nitratos, arsénico, selenio
AEÑ8	Fosfatos, nitratos, selenio
DEÑ9	Fosfatos, nitratos, selenio
ICA14	Fosfatos, nitratos, arsénico, selenio
FCA15	Fosfatos, nitratos, arsénico, selenio
PUS16	Fosfatos, nitratos, arsénico, selenio
DET19	Fosfatos, arsénico, selenio

Los resultados indican que todos los puntos de muestreo presentaron dos o más parámetros fuera de los establecido en la norma. Por ello, todos se clasificaron como clase de calidad “moderado (no aceptable)”.

Por los importantes problemas de eutrofización asociados destacan los contenidos en **fosfatos**, por encima de 0,4 mg/L en gran parte de las muestras y con un incremento a lo largo del río Tajo (Tabla 6). En este caso, los valores más altos no se dan en el río Jarama, a diferencia de todos los demás parámetros relacionados con materia orgánica y estado trófico, sino que se obtiene un aumento progresivo después de la entrada de este afluente. Para evitar esta problemática, se debe favorecer la eliminación de estos compuestos de los vertidos de industrias y agricultura en las EDARs antes de que estos lleguen a los ríos (Velusamy *et al.*, 2021).

Para los compuestos nitrogenados, en todas sus formas, sí se observa una calidad significativamente peor en el río Jarama (Tabla 6) y un ligero proceso de autodepuración a lo largo del río Tajo. También es importante destacar la alta concentración de **nitratos** en todos los puntos muestreados, con valores del orden o superiores a 25 mg/L en todas las muestras, excepto DET19. Destaca por su alto valor el río Jarama (129 mg/L) y el punto del río Tajo justo después de la entrada del Jarama (56,6 mg/L en AEÑ8). La problemática relativa a la presencia de elevadas concentraciones de nitratos en ríos, debido a que favorece los procesos de eutrofización y disminuye así la calidad del agua (Omer, 2019), ha sido recientemente abordada en el Real Decreto 47/2022 sobre la protección de agua frente a nitratos, donde se categoriza la contaminación por este compuesto como origen difuso y como un problema central en la política ambiental y agraria. Por este motivo, se han planteado estrategias, como la reducción del 20% del uso de fertilizantes, en orden con la “Estrategia de Biodiversidad para 2030”, como medida para abordar este problema (Real Decreto 47/2022).

Para las sustancias preferentes, encontramos que en todos los casos uno o varios parámetros se encuentran fuera de la media anual. Cabe destacar también que en todos los casos se superaron los valores de media anual para el selenio y en bastante de ellos para el arsénico, si bien no existe una fuente o presión clara que explique el incumplimiento de la normativa.

Según la Directiva Marco de Agua, la evaluación del **estado químico** se corresponde con la medición del cumplimiento de las NCA establecidas para los contaminantes presentes en una



masa de agua (sustancias prioritarias y otros contaminantes), es decir, el cumplimiento del Anexo IV del RD 817/2015. Así, el estado químico es evaluado en base a las NCA-CMA (CMA: concentración máxima admisible) aplicables a las concentraciones de sustancias prioritarias en las aguas superficiales. Las sustancias a tener en cuenta para esta evaluación son cadmio, plomo, mercurio y níquel. Además, al igual que para el cobre y zinc, para la evaluación del cadmio es necesario considerar la dureza del agua, siendo todas las muestras de clase 5 al presentar un valor > 200 mg/L CaCO₃.

En la Tabla 11, se presentan los resultados obtenidos tras la evaluación realizada de acuerdo a lo dictado en las normas. Las categorías de clasificación que se han seguido son “bueno” (verde) o “no alcanza el buen estado químico” (rojo) en función de los resultados procedentes del estudio.

Tabla 11. Resultados de la evaluación química según la NCA en el periodo de estudio.

Muestras	Sustancias prioritarias*			
	Hg	Pb	Ni	Cd
AEF4	Rojo	Verde	Verde	Verde
DEF5	Verde	Verde	Verde	Verde
J7	Rojo	Verde	Rojo	Verde
AEÑ8	Rojo	Verde	Verde	Rojo
DEÑ9	Rojo	Verde	Verde	Verde
ICA14	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
FCA15	Rojo	Verde	Rojo	Verde
PUS16	Rojo	Verde	Verde	Verde
DET19	Rojo	Verde	Verde	Verde

*: Anexo IV del RD 817/2015; Hg (mercurio), Pb (plomo), Ni (níquel), Cd (cadmio)

Para las sustancias prioritarias, encontramos que, en casi todos los casos, salvo la muestra DEF5, uno o varios parámetros se encuentran fuera del límite máximo permitido. Por tanto, la muestra DEF5 es la única que cumple con los requerimientos de dichas NCA y presenta un buen estado químico según esa clasificación.

Cabe destacar también que en prácticamente todos los puntos muestreados se superaron los valores límites para el mercurio si bien no existe una fuente o presión clara que explique el incumplimiento de la normativa

5.2. Contaminantes emergentes

En el barrido de fármacos realizado, se han detectado un total de 24 compuestos y todas las muestras al menos tuvieron presencia de 2 de ellos. Las concentraciones se encontraron en el rango de ng/L (Tabla 8).

En la Figura 7 se representa la **concentración total acumulada** de compuestos detectados. La muestra J7 (río Jarama), con un valor superior a 3,5 µg/L, es la que contiene la mayor concentración de CEs. Las muestras aguas arriba de la desembocadura del Jarama presentan concentraciones acumuladas inferiores a 300 ng/L, es decir menos de la décima parte. Las muestras aguas abajo de ese punto presentan concentraciones acumuladas entre 1,0 y 1,7 µg/L.

Esto indica no solo que la contribución de CE del río Jarama es importante, sino que esta no llega a ser mitigada a lo largo del tramo estudiado del río Tajo, puesto que las concentraciones no recuperan los niveles aguas arriba de la desembocadura del Jarama.

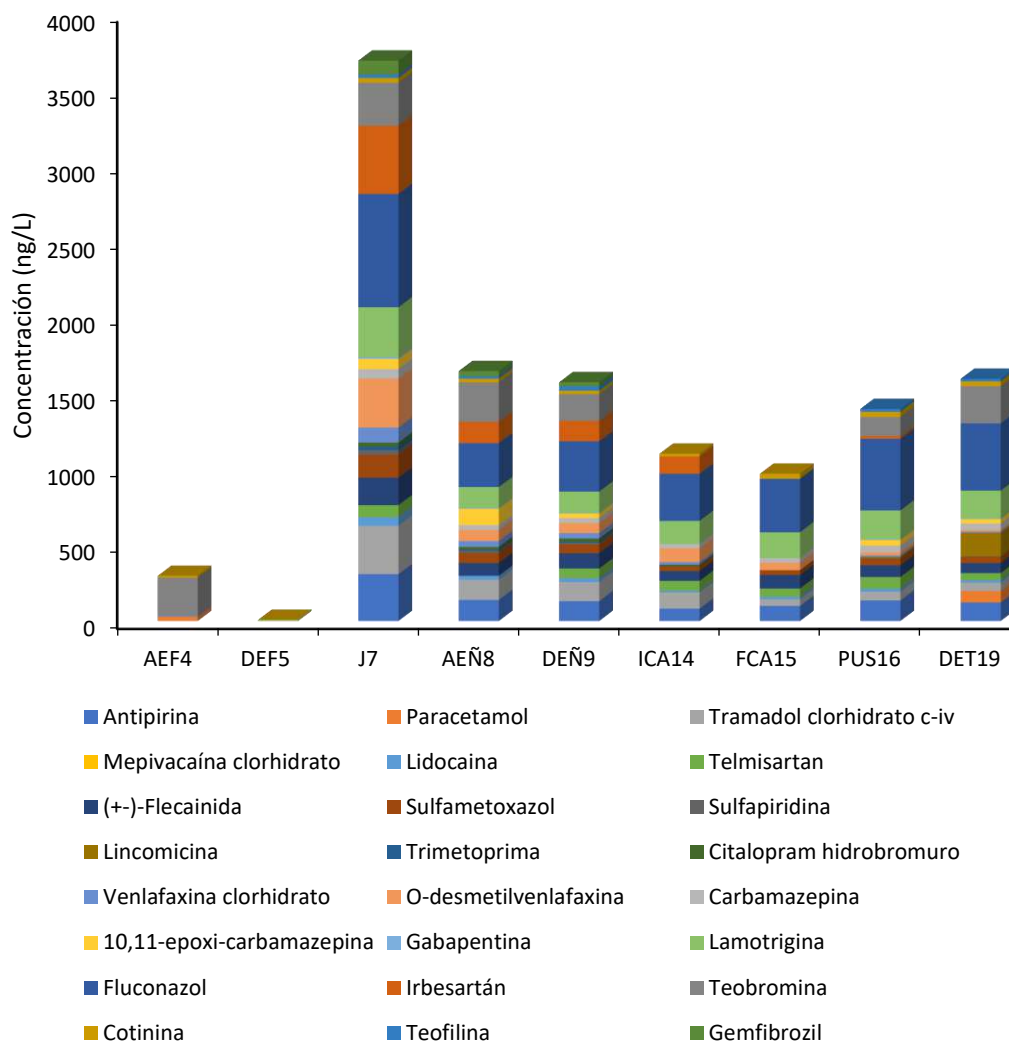


Figura 7. Concentración acumulada (ng/L) de los contaminantes emergentes detectados en cada punto de muestreo.

La mayor concentración de cada uno de los CE detectados se da en J7, excepto en los casos de 10,11-epoxi-carbamazepina y teofilina. Se han encontrado concentraciones superiores a 100 ng/L de la mitad de los compuestos en, al menos, una muestra. Excluyendo el punto DEF5, en todas las muestras se ha detectado algún CE por encima de 100 ng/L.

Aguas abajo de J7, lamotrigina (antiepiléptico/anticonvulsivo) y fluconazol (antifúngico) están presentes en todas las muestras en concentraciones superiores a 100 ng/L. El analgésico/antiinflamatorio antipirina y los antihipertensivos irbesartán y teobromina están por encima de ese nivel en la mayoría de las muestras. De todos los compuestos, el fluconazol



(antifúngico) se encuentra entre los de mayor concentración (entre 290 y 748 ng/L) y se detectó en J7 y en todas las muestras que se encuentran aguas abajo (7 de 9 muestras) (Tabla 8).

En la Figura 8 se representa la **frecuencia** con la que se han encontrado los CE, es decir, el porcentaje de muestras en las que un determinado compuesto está presente. Los compuestos más frecuentes a lo largo del tramo medio del río Tajo fueron cotinina (estimulante), lamotrigina (antiepiléptico) y tramadol clorhidrato (analgésico), ya que se encuentran en el 90 % de las muestras. Sin embargo, mepicavacaína clorhidrato (anestésico) solo se detectó en una muestra. En el caso de la cotinina, metabolito de la nicotina, nuestros resultados coinciden con lo encontrado por Valcárcel *et al.* (2013), quienes detectaron este compuesto en todas las muestras de su estudio en el río Tajo.

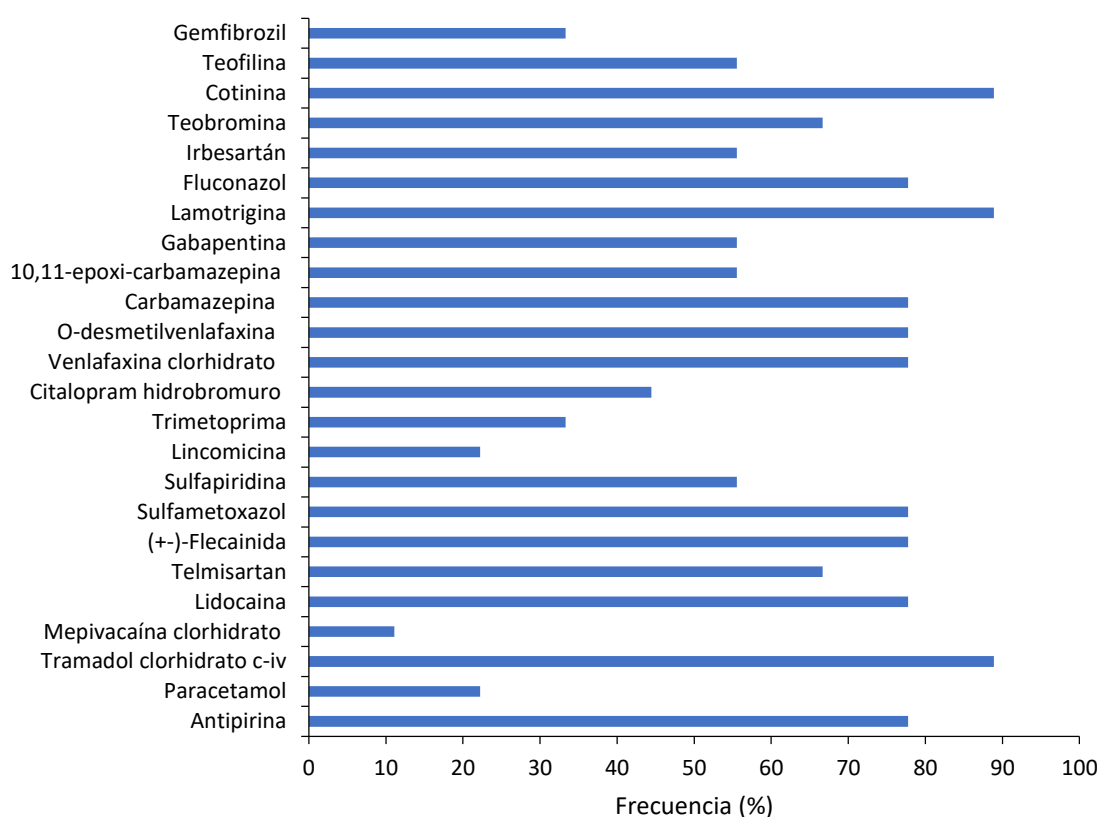


Figura 8. Frecuencia de detección en todas las muestras analizadas de cada uno de los compuestos.

Este estudio preliminar demuestra que la presencia de fármacos en la cuenca del río Tajo se debe principalmente al aporte del río Jarama. Esto se pone de manifiesto por la ausencia de la mayoría de los compuestos en los puntos AEF4 y DEF5, situados aguas arriba de la desembocadura del río Jarama en el río Tajo, y por la presencia de los compuestos encontrados en el río Jarama (J7) y aguas abajo de su desembocadura. Después de la entrada el río Jarama, las aportaciones debidas a otro tipo de actividades, por ejemplo, las EDARs, no tienen un impacto tan significativo. Aunque puntualmente pueden dar lugar a un aumento de algunos compuestos, como teofilina, fluconazol, gabapentina, lamotrigina, carbamazepina, citalopram y



flecainida después de EDAR de Añover de Tajo (DEÑ9), o paracetamol, lincomicina o teobromina después de la EDAR de Talavera (DET19).

De todos los compuestos detectados, cinco de ellos, sulfametoxazol (antibiótico), trimetoprima (antibiótico), venlafaxina (antidepresivo), o-desmetilvenlafaxina (antidepresivo) y fluconazol (antifúngico), se incluyen dentro de la última **lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión Europea** en el ámbito de la política de aguas (Decisión (EU) 2022/1307). Todas las muestras de este estudio presentaron concentraciones superiores a las establecidas en este documento para los compuestos fluconazol, o-desmetilvenlafaxina y venlafaxina, a excepción del punto AEF4 en este último compuesto. Además, la concentración de sulfametoxazol en el río Jarama (J7) también fue superior a la prevista como sin efecto.

Precisamente uno de estos compuestos, el fluconazol (antifúngico), ha sido el detectado a mayor concentración (290 – 748 ng/L) en el presente trabajo. La máxima concentración se da en el río Jarama y continúa siendo elevada en el curso del río Tajo. El fluconazol ha sido determinado en un estudio reciente (Wilkinson *et al.*, 2022), y a pesar de que no detectó en la mayoría de las muestras, se encontró en una concentración elevada (2,1 µg/L), en algunos casos como el río Nairobi (Kenia, Africa).

Por su elevado consumo, los **analgésicos**, como el paracetamol, se miden frecuentemente en los estudios de CEs. Sin embargo, en el presente trabajo, solamente se ha detectado en dos muestras, siempre por debajo de 80 ng/L. En el estudio de Wiegel *et al.* (2004), se encontró este compuesto hasta en el 67% de los puntos de muestreo, con niveles entre <5 y 66 ng/L. En otras cuencas fluviales de Europa se han detectado concentraciones hasta unas cuatro veces superiores (305 ng/L) (Stamatis *et al.*, 2013).

Otro compuesto ampliamente identificado en los ríos es el **regulador lipídico**, gemfibrozilo. Sin embargo, en el presente trabajo solamente se ha detectado en un tercio de las muestras en concentraciones entre 26,0 y 91,5 ng/L. Se ha encontrado gemfibrozil en concentraciones superiores a las del presente trabajo en la cuenca del Ebro (Gros *et al.*, 2007), llegando incluso a 2 µg/L en el propio río Tajo (Rico *et al.*, 2019). No obstante, también se ha hallado en concentraciones inferiores en otras cuencas europeas, 10,34 ng/L (Pereira *et al.*, 2017). También, ha sido hallado en concentraciones similares a la mínima encontrada en ríos europeos como el Elba en Alemania (Wiegel *et al.*, 2004; Loos *et al.*, 2009).

En cuanto a los **antidepresivos**, según la Agencia Española del Medicamento, del año 2000 al 2013 se incrementó un 200 % el consumo, por tanto, no es de extrañar que este grupo de compuestos se halle en los ríos (AEMPS, 2015). En el presente trabajo, citalopram y venlafaxina se han encontrado en 4 y 7 muestras respectivamente. El intervalo de concentraciones de citalopram fue 11,4 – 27,2 ng/L, mientras que el de venlafaxina fue 4,9 – 99,2 g/L, siendo de nuevo la muestra J7 la que mostró mayor concentración de ambos y pudiéndose también detectar en las muestras aguas abajo. Las concentraciones de citalopram son superiores a las encontradas en otro estudio realizado en el río Tajo (< 1 ng/L), sin embargo, venlafaxina se encontraba en concentraciones similares e incluso inferiores en alguno de los puntos, 3-19 ng/L (Valcárcel *et al.*, 2013). En otro estudio llevado a cabo en cuencas españolas, entre las que se incluye el río Tajo, la concentración de citalopram estuvo por debajo del límite de cuantificación y venlafaxina se cuantifica en 22 ng/L (Alonso *et al.*, 2010). Collado *et al.* (2014) detectaron venlafaxina en concentraciones de 309 ng/L en el río Ter, concentración más de tres veces



superior a la detectada en el punto J7. Otro estudio, realizado en el río Mijares, ha hallado venlafaxina a una concentración de hasta 800 ng/L (Fonseca *et al.*, 2020).

Otros CE que normalmente son objeto de análisis son los **antiepilépticos**, como la carbamazepina. Se ha detectado este compuesto en el Jarama (62 ng/L) y en todas las muestras aguas abajo (27,9 – 62,8 ng/L). En bibliografía se encuentran niveles inferiores en cuencas españolas y europeas (Madureira *et al.*, 2010; Collado *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2020), similares (Gros *et al.*, 2007) y superiores a los 100 ng/L (Wiegel *et al.*, 2004; Rico *et al.*, 2019). Sin embargo, también se han reportado casos con niveles claramente superiores, llegando a 1 µg/L (Alonso *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2014).

Además de los fármacos más frecuentemente estudiados como CE, en este estudio preliminar se han detectado algunos que hasta el momento han sido objeto de menor atención en bibliografía. Es el caso de irbesartán, utilizado para tratar la **hipertensión**, se ha encontrado en un rango de 18,1 – 450 ng/L, siendo su máximo en la muestra tomada en el río Jarama. Se ha detectado en el río Mijares con una concentración de 1,7 µg/L (Fonseca *et al.*, 2020). También es el caso de gabapentina (**antiepiléptico/anticonvulsivo**) y lidocaína (**anestésico**), con concentraciones máximas de 11,5 y 57,7 ng/L, respectivamente, en el río Jarama. En bibliografía, se han determinado estos dos compuestos recientemente en el 42% de las muestras en el caso de gabapentina y 16% en el de lidocaína (Fonseca *et al.*, 2020) aunque en concentraciones inferiores a las descritos en nuestro estudio. En el río Manzanares (Madrid, España), se ha detectado la gabapentina a una concentración de 13,4 µg/L y en el río Trinity (Dallas, EE.UU.) la lidocaína a 807 ng/L (Wilkinson *et al.*, 2022)

También se pueden considerar CE los **productos de degradación y/o metabolitos de fármacos**. En algunos casos, se sabe que estos derivados comportan mayor riesgo ambiental que los compuestos de los que proceden. En el presente trabajo se han detectado O-desmethylvenlafaxina y 10,11-epoxycarbamazepina. Las concentraciones del primer metabolito fueron superiores a las del precursor en todas las muestras, mientras que las concentraciones del segundo fueron inferiores a las de su precursor, también en todas las muestras.

En lo que respecta a los **antibióticos**, de los cuatro detectados en las muestras, dos de ellos, sulfametoxazol y trimetoprima, se han hallado en la gran mayoría de estudios realizados en otros ríos de cuencas europeas (incluyendo las cuencas españolas y la del Tajo). Estos dos compuestos combinados son la base de productos zoonosanitarios para el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas.

El sulfametoxazol se ha encontrado en concentraciones similares a las del presente trabajo (30,7 – 152 ng/L) en la cuenca del río Ebro (Gros *et al.*, 2007), aunque también en concentraciones inferiores en diversos estudios de cuencas españolas (Madureira *et al.*, 2010; Collado *et al.*, 2014), cuencas europeas (Wiegel *et al.*, 2004; Loos *et al.*, 2009) y en la cuenca del Tajo (Rico *et al.*, 2019). Sin embargo, en otros trabajos realizados en cuencas españolas se encuentra a concentraciones superiores, hasta 200 ng/L (Fonseca *et al.*, 2020).

En el caso de trimetoprima, Madureira *et al.* (2010) obtuvieron concentraciones similares a las del presente trabajo (7,38 – 22,6 ng/L), a diferencia de otro estudio realizado en la cuenca del Ter donde la concentración detectada fue menor, 5 ng/L (Collado *et al.*, 2014). Recientemente



se han detectado niveles de 100 ng/L en la cuenca del río Tajo (Rico *et al.*, 2019) e incluso de 720 ng/L en el río Mijares, al noreste de España (Fonseca *et al.*, 2020).

Los otros dos antibióticos detectados en nuestras muestras, lincomicina (6,90 -155 ng/L) y sulfapiridina (2,86 – 29,8 ng/L) también se han encontrado en otros estudios realizados hasta la fecha. Fonseca *et al.* (2020) detectaron lincomicina a 11 ng/L, concentración inferior a la del punto DET19 y superior a la de PUS16. En cuanto a sulfapiridina, se encontró en el 79% de las muestras entre 75 y 100 ng/L en la cuenca del río Miño (Iglesias *et al.*, 2012).

El estudio de los CE en aguas es de creciente importancia para establecer la calidad de estas. Mientras que las EDARs no sean capaces de eliminar de manera eficiente estos compuestos, se comportarán como fuentes y será necesario su control. También es necesario profundizar en este estudio incorporando el factor estacionalidad, que juega un papel muy importante en la diseminación de CE y puede permitir conocer con más detalle la dispersión de estos compuestos en las masas de agua y los riesgos asociados (Valcárcel *et al.* 2013; Pereira *et al.*, 2017).

5.3. Caracterización microbiológica

5.3.1. Recuento de microorganismos y bacterias resistentes a antibióticos

Los recuentos de **bacterias viables totales** obtenidos (Tabla A4) en las aguas de los diferentes puntos de muestreo coinciden con los publicados para otros ríos, tanto españoles, como el río Tinto (Huelva, España) (Eduardo-Correia *et al.* 2020) como europeos (Makowska *et al.*, 2016). Por el contrario, son mayores que los descritos para el río italiano Tíber $2,87 \times 10^3$ UFC/100 mL (Navarro *et al.* 2023) e inferiores a los cuantificados en la cuenca del río Warnow, (Alemania), $2,4 \times 10^9$ UFC/100 mL (Freese *et al.*, 2006). Estos hechos ponen de manifiesto que, a pesar de que se muestree en la misma época del año (estación cálida), son muchas las variables que influyen en la presencia de microorganismos en las aguas de los ríos, por lo que es muy difícil establecer comparaciones.

El estudio de los **hongos filamentosos** cultivables en aguas de río ha recibido poca atención, en comparación con otros tipos de microorganismos como las bacterias o los protozoos. Sin embargo, en la última década ha aumentado el interés por este grupo de microorganismos ya que su presencia en el agua puede contribuir a la degradación de sustancias naturales y antropogénicas complejas, debido a su importante diversidad metabólica. Los valores de los recuentos de hongos filamentosos obtenidos en este estudio preliminar están dentro de los rangos obtenidos en otras aguas superficiales (aproximadamente $1,25 \times 10^3$ UFC/100 mL). En trabajos futuros sería muy interesante proceder a la identificación de los aislados obtenidos en este estudio para evaluar su potencial degradador (Pereira *et al.*, 2010).

Las **bacterias fecales** pueden llegar a los ecosistemas acuáticos no sólo por el vertido de aguas residuales, sino también a través de la escorrentía superficial y la lixiviación del suelo (Sidrach-Cardona *et al.* 2014). Los recuentos de bacterias fecales obtenidos en este estudio han puesto de manifiesto una elevada carga de bacterias fecales en las aguas de todas las zonas muestreadas. Los resultados publicados para otros ríos son muy dispares, así un trabajo realizado en ríos brasileños puso de manifiesto concentraciones de *E. coli* que oscilaron entre $2,28$ y $9,96 \times 10^4$ UFC/100 mL, superiores a los obtenidos en nuestro estudio (Böger *et al.*, 2021), y otro realizado en ríos polacos describe concentraciones entre 3 UFC/100 mL y 2×10^6 UFC/mL



(Lenart-Borón, 2017). En otro estudio en ríos polacos (Makowska *et al.*, 2016), los recuentos de coliformes fueron similares a los nuestros. Pereira *et al.* (2013) estudiaron la cuenca del Tajo para ver el impacto de distintos tipos de vertidos y analizaron el contenido de bacterias coliformes totales y *E. coli*, comprobando que los puntos que generaban un mayor aporte de contaminación eran los procedentes de las zonas altamente urbanizadas, detectándose en ellos concentraciones de hasta 10^8 UFC/mL. Estos resultados ponen otra vez de manifiesto que la presencia tanto de coliformes totales como de *E. coli* está, como es de esperar, muy influida por las actividades antropogénicas de la zona. Los coliformes son hasta la fecha los indicadores de contaminación fecal más utilizados por su especificidad de origen.

En lo que se refiere a las **bacterias resistentes a antibióticos**, cabe destacar que, en este estudio preliminar, se ha analizado la presencia de bacterias resistentes a 4 antibióticos en las aguas de distintos puntos del tramo medio del río Tajo sin seleccionar ningún grupo bacteriano concreto. La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en aguas de ríos que reciben emisiones de las EDAR, mataderos e industrias farmacéuticas, tiene un gran impacto en la propagación de las mismas en el medio ambiente (Pérez-Etayo *et al.*, 2020). En consonancia con esto, los resultados de este estudio han puesto de manifiesto un aumento del porcentaje de bacterias viables resistentes a sulfametoxazol en las aguas de los puntos de muestreo aguas debajo de los vertidos de la EDAR (DEÑ9). Por el contrario, los porcentajes de bacterias resistentes a la ampicilina y a la doxiciclina disminuyeron en este punto.

Marti *et al.* (2014) realizaron una evaluación de la presencia de bacterias resistentes a la ciprofloxacina en las aguas del río Ter (Cataluña, España) y del impacto que tienen las EDARs en la aparición de bacterias resistentes a este antibiótico. Concluyeron que mientras que aguas arriba el porcentaje de bacterias resistentes a este antibiótico era del 1,24%, en aguas abajo era de un 7,35 %, a diferencia de lo observado en nuestro estudio, donde los porcentajes de bacterias resistentes a este antibiótico son menores.

En una investigación realizada en el río Lyna (Polonia) (Harnisz, 2013) determinó la resistencia bacteriana a la doxiciclina obteniéndose resultados similares a los encontrados en el tramo medio del río Tajo. En otro estudio realizado en ríos europeos (Navarro *et al.*, 2023), se describe la presencia de una menor cantidad (1×10^3 UFC/100 mL) de bacterias resistentes a la ampicilina que en nuestro trabajo, mientras que en otro realizado en las cuencas españolas de los ríos Tinto, Odiel y Piedras (Eduardo-Correia *et al.*, 2020), comprobaron que alrededor del 25% de las bacterias cultivables totales eran resistentes a la ampicilina.

En cuanto a las bacterias resistentes al sulfametoxazol, se han encontrado datos relativos a ríos de cuenca europea en un rango de entre 1×10^2 y $2,2 \times 10^4$ UFC/100 mL (Makowska *et al.*, 2016), en concordancia con los obtenidos en nuestro estudio. En una investigación realizada en cuencas sudafricanas (Tucker *et al.* 2022), se describe la presencia de hasta un 30% de bacterias resistentes a esta sulfonamida, que los autores explican por el impacto antropogénico de la zona.

La presencia de **bacterias fecales resistentes a antibióticos** en ecosistemas acuáticos puede aumentar el riesgo biológico y agravar su impacto en la salud pública (Davison, 1999). En la revisión bibliográfica efectuada, se ha encontrado un estudio en aguas de cuencas brasileñas (Böger *et al.* 2021) en el que se cuantifican las bacterias fecales resistentes a la ciprofloxacina, el sulfametoxazol y la doxiciclina y, en otro realizado en aguas de la cuenca del Júcar (España),



Amato *et al.* (2021) describen el aislamiento de cepas de *E. coli* resistentes a la ampicilina, el sulfametoxazol y la ciprofloxacina. Sería necesario en un estudio ampliado caracterizar a qué son resistentes las bacterias fecales del río Tajo.

Las cepas de *Acinetobacter* resistentes a los antibióticos han sido consideradas por la OMS como un grupo de bacterias, para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos eficaces, ya que muchas de ellas, sobre todo las pertenecientes a la especie *A. baumannii*, presentan resistencia a los carbapenémicos, considerados antibióticos de último recurso (ECDC, 2017; Serwecińska *et al.*, 2021). Por ello, su presencia en el medio ambiente (en este estudio se han aislado una media de $1,16 \times 10^4$ UFC/100 mL) lleva implícita una amenaza para la salud humana, por la posible transferencia horizontal de genes. La Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos afirma que en muestras clínicas los aislados de *Acinetobacter spp.* con resistencia a los carbapenémicos, supera el 80% en algunos países (ECDC, 2017).

5.3.2. Genes de resistencia

La presencia en aguas de genes de resistencia a antibióticos son motivo de un creciente interés por los riesgos que supone la transferencia de los mismos entre organismos. Cabe destacar que en las aguas analizadas en este estudio solo se detectó la presencia de 4 de los 11 genes analizados (*blaTEM*, *sul1*, *sul2* e *int1*). La ausencia de amplificación del gen *mecA*, que codifica para la proteína PBP (de las siglas en inglés “*Penicillin-Binding Protein*”) responsable de la resistencia a la metilicina, se relaciona con la baja presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina por producción de β -lactamasas. No obstante, existen otros factores cromosómicos implicados en la resistencia a las penicilinas, por lo que no es concluyente la inexistencia de resistencia a la metilicina (Llarrull *et al.*, 2009). En coincidencia con Pérez-Etayo *et al.* (2020) en las aguas analizadas en nuestro estudio, no se detectaron los genes *tetB*, *tetC* y *vanA*. Por el contrario, Osińska *et al.* (2016) describen la amplificación del gen *tetB*, pero no del *tetC*.

La resistencia a los antibióticos de último recurso es un grave problema a nivel sanitario (Comunicación 2017/339). Dos de ellos son los carbapenémicos y la colistina, siendo los genes implicados en su resistencia el *blaKPC* y el *mcr-1*, respectivamente. En las aguas analizadas, no se ha amplificado ninguno de estos dos genes, sin embargo, *mcr-1* sí se ha descrito en los ríos Cardener y Llobregat (Ovejero *et al.*, 2017) y *blaKPC* se ha detectado en la cuenca de ríos europeos (Teixeira *et al.*, 2022).

Los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, utilizados como referencia en este estudio, son los implicados en la resistencia a las quinolonas, un grupo de antibióticos de amplio espectro. Ninguno de ellos ha sido detectado en las muestras del tramo medio del río Tajo analizadas, en coincidencia con otro estudio realizado en este mismo río por Pereira *et al.* (2013). Otros trabajos muestran una mayor prevalencia de estos genes en ríos de cuencas españolas (Amato *et al.*, 2021) y, en ríos de cuencas europeas, se encontraron también en raras ocasiones según concluyen Osińska *et al.* (2016).

Cabe destacar que, en nuestro estudio, se obtuvo crecimiento de colonias bacterianas en las placas de agar TSA que contenían ciprofloxacina y doxiciclina, pero no se han amplificado los genes implicados en la resistencia a las quinolonas y a las tetraciclinas en las mismas aguas. Se han descrito diversos mecanismos por los que las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos y, a pesar de la relación gen-antibiótico, no siempre se determinan ambos



parámetros en una muestra, debido a la implicación de otros factores intrínsecos de resistencia de las propias bacterias (Reygaert, 2018).

Los antibióticos β -lactámicos han sido la opción terapéutica más extendida para el tratamiento de infecciones humanas y animales en todo el mundo y, en consecuencia, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia a los β -lactámicos en los que están implicados genes como **blaTEM** (Pérez Etayo *et al.*, 2020). Los resultados positivos para el gen **blaTEM** en todas las muestras analizadas concuerdan con estudios anteriores realizados en la cuenca del río Tajo (Pereira *et al.*, 2013), en otras cuencas españolas (Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Pérez-Etayo *et al.*, 2020; Amato *et al.*, 2021) y en cuencas europeas (Lenart- Borón, 2017; Cacace *et al.*, 2019). Los resultados del resistoma, en este caso, coinciden con la presencia de bacterias resistentes a la ampicilina en todas las muestras analizadas en este estudio preliminar.

Con respecto al segundo grupo de genes detectados, los genes **sul1** y **sul2**, implicados en la resistencia a sulfonamidas, se ha descrito que su presencia en el medio ambiente es consecuencia de la actividad ganadera ya que se usa extensamente en este sector (Pereira *et al.*, 2013; Cacace *et al.*, 2019). Este hecho explicaría su presencia en las aguas del punto de muestreo ICA14 situado en una finca perteneciente de ganado bovino. Al igual que hemos mencionado para la ampicilina, en este estudio, se han obtenido resultados concordantes para la presencia de bacterias resistentes al sulfametoxazol en las placas de TSA que contenían ente antibiótico y la presencia de genes de resistencia a las sulfonamidas en las mismas aguas.

Por último, los resultados para la expresión de **int-1**, coinciden con lo descrito por Pereira *et al.* (2013), donde lo describen en aislados de *E. coli* en el río Tajo, y con otros estudios realizados en cuencas europeas (Cacace *et al.*, 2019; Sabri *et al.*, 2020).

6. Conclusiones

En este trabajo se ha realizado una evaluación de la presencia de CEs, con especial atención a los antibióticos, y de bacterias resistentes y genes de resistencia en zonas RN2000 incluidas en el tramo medio del río Tajo en la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha. Los resultados presentados corresponden a un único muestreo realizado en verano de 2022, por lo que sólo se pueden extraer conclusiones que se consideran preliminares. En todo caso, se trata de resultados interesantes y prometedores que permiten tener un conocimiento previo para plantear estudios más completos, que sin duda son necesarios en estos espacios protegidos con un alto valor ecológico.

Para tener una visión general del tipo de aguas y estado general en el que se encontraban, en primer lugar, se llevó a cabo una caracterización físico-química. Desde el punto de vista del estado ecológico, ninguno de los puntos de muestreo alcanza un buen estado al presentar una calidad “moderada” en base a los indicadores físico-químicos. Cabe destacar los altos contenidos encontrados para compuestos relacionados con problemas de eutrofización, como fosfatos y nitratos, especialmente en el río Jarama. Asimismo, en cuanto al contenido en sustancias contaminantes preferentes destaca que las concentraciones de selenio rebasaron en todos los casos los valores establecidos en las normas de calidad ambiental. De igual manera, en cuanto al estado químico de las masas de agua estudiadas, se observó que únicamente una de las muestras (DEF5) presenta un estado químico bueno ya que el resto presentó niveles de mercurio por encima de la concentración límite establecida.



En cuanto a los CE, se ha detectado la presencia de hasta 24 de los 80 fármacos investigados. Las familias a las que pertenecen son muy diversas, así se incluyen analgésicos/antiinflamatorios, anestésicos, antiarrítmicos, antibióticos, antidepresivos, antiepilépticos/anticonvulsivos, antifúngicos, antihipertensivos, estimulantes y reguladores lipídicos. La presencia de estos compuestos está directamente relacionada con los aportes del río Jarama. Además, se observa que la contribución de CE del río Jarama es muy importante y no llega a ser depurada a lo largo del tramo estudiado.

Algunos de los compuestos detectados, sulfametoxazol (antibiótico), trimetoprima (antibiótico), venlafaxina (antidepresivo), o-desmetilvenlafaxina (antidepresivo) y fluconazol (antifúngico)), están incluidos en la lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento de la UE en política de aguas y se han hallado en concentraciones superiores a las que se estima que no tienen efectos toxicológicos. Destaca de esta lista la presencia del antifúngico fluconazol, que es la sustancia encontrada con más frecuencia y en mayor concentración en este estudio. En cuanto a los antibióticos, es reseñable la presencia de sulfametaxazol, especialmente en el río Jarama. Además de sulfametaxazol y trimetoprima, también se han detectado otros antibióticos como licomicina y sulfapiridina. La presencia de estos compuestos farmacológicos genera un gran interés en continuar ampliando este estudio en relación con los problemas de resistencia que pueden estar asociados.

En todas las muestras analizadas se ha puesto de manifiesto la presencia tanto de bacterias resistentes como de genes de resistencia. Por lo tanto, los resultados microbiológicos obtenidos, plantean la necesidad de hacer un seguimiento exhaustivo de la presencia de bacterias resistentes y de genes de resistencia, para evitar su propagación y prevenir los impactos negativos que estos pueden tener sobre el ecosistema y la sociedad. Esto permitirá identificar los factores que contribuyen a la aparición de resistencias y, por ende, facilitará la adopción de medidas oportunas y efectivas para reducirlas. Además, con esta información, se puede planificar el uso del agua de forma sostenible y equilibrada, fomentando la conservación de los recursos hídricos. El seguimiento de la aparición de resistencias a los antibióticos en los ríos es un elemento clave en la gestión y planificación ambiental del territorio, ya que ayuda a tomar decisiones informadas en materia de infraestructura hidráulica, uso del suelo y manejo de los recursos naturales, contribuyendo a su vez a la protección de la vida humana y la biodiversidad.

El hecho de que estén descritos diferentes mecanismos implicados en la aparición de las resistencias a los antibióticos, hace que no sea posible afirmar rotundamente que la ausencia de genes implica que no haya resistencia. Asimismo, la no detección de algunos genes de resistencia a antibióticos no permite concluir que las aguas analizadas, las del río Tajo, en el caso que nos ocupa, tengan unas condiciones óptimas y saludables.

7. Futuras investigaciones

Cabe destacar que es muy difícil obtener conclusiones sobre el estado de la cuenca media del río Tajo en cuanto contaminación por emergentes y bacterias resistentes a partir de un único muestreo realizado en verano. Sería necesario la continuidad de estos muestreos, tanto en todas las estaciones del año como en más de una anualidad para que los resultados pudieran ser concluyentes.



En lo referente a CEs, el mero hecho de su detección implica la necesidad de continuar y profundizar en el análisis de estos compuestos, ampliando el estudio a otras familias de fármacos de amplia difusión, como las cefalosporinas, e incluso a otros tipos de compuestos, como productos de higiene y cuidado personal. También se podría plantear un análisis dirigido (en lugar de no dirigido, como se ha hecho en este caso) si la situación lo aconseja, por ejemplo, en el caso de algún vertido puntual de un compuesto o una familia de compuestos determinado, como los antibióticos encontrados. En estos casos será necesario validar los métodos existentes y, si no existen, desarrollar y optimizar nueva metodología.

En cuanto al estudio microbiológico llevado a cabo, es muy importante puntualizar que los encontrados en la literatura utilizan concentraciones de antibióticos en los medios para hacer los recuentos muy dispares a las del estudio realizado. Este hecho hace difícil la comparativa de porcentajes de bacterias resistentes, por lo que es necesario, una vez obtenidos cultivos puros representativos de toda la microbiota, caracterizar por el método de difusión en disco su resistencia. Para tal fin, de todas las placas donde se realizaron los recuentos bacterianos, se aislaron y purificaron 5 colonias con lo cual tenemos una colección de 467 aislados. Sería de gran interés realizar un genotipado e identificarlos, puesto que proporcionaría una valiosa información sobre la prevalencia de géneros y especies patógenas o no entre la microbiota aislada. Además, sería muy recomendable, como ya hemos indicado, averiguar el porcentaje de *Acinetobacter spp.* resistentes a carbapenémicos. También hemos obtenido de este muestreo una colección de hongos aislados de las placas de Rosa de Bengala que sería de gran interés identificar.

Por otro lado, sería interesante someter las muestras de ADN extraídas a análisis mediante técnicas de secuenciación masiva, con lo que la información sobre el microbioma y el resistoma sería sustancialmente ampliada. Resultaría también de interés ahondar en el hecho de que se detecte la expresión de genes de resistencia a dos de los antibióticos encontrados.

En definitiva, ampliar este estudio y hacer un seguimiento tanto de la presencia de CEs como de bacterias resistentes en ecosistemas tan valiosos como los que pertenecen a Red Natura 2000 es crucial para garantizar un desarrollo sostenible y una gestión adecuada de los recursos hídricos a largo plazo.



8. Referencias

- AEMPS, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2015). Informe de utilización de medicamentos U/AD/V1/14012015. Utilización de medicamentos antidepresivos en España durante el periodo 2000-2013.
- Alonso, S. G., Catalá, M., Maroto, R. R., Gil, J. L. R., de Miguel, Á. G., & Valcárcel, Y. (2010). Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International*, 36, 195-201
- Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., Hasan, H., & Ravichandran, M. (2014). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a newly developed dry reagent-based polymerase chain reaction assay. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47, 484-490.
- Amato, M., Dasí, D., González, A., Ferrús, M. A., & Castillo, M. Á. (2021). Occurrence of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in agricultural irrigation waters from Valencia city (Spain). *Agricultural Water Management*, 256, 107097.
- Böger, B., Surek, M., de O Vilhena, R., Fachi, M. M., Junkert, A. M., Santos, J. M., Pontarolo, R., *et al.* (2021). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123448.
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C. M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Berendonk, T. U., *et al.* (2019). Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, 162, 320-330.
- CHT, Confederación Hidrográfica del Tajo, O.A. (2022). Plan Hidrológico de la parte española de la Demarcación Hidrográfica del Tajo. Revisión de tercer ciclo (2022-2027). Apéndice 1. Masas de agua superficial. Caracterización de las masas de agua. *Confederación Hidrográfica del Tajo O.A.*
- Collado, N., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Rubirola, A., Barceló, D., Comas, J., Buttiglieri, G., *et al.* (2014). Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environmental Pollution*, 185, 202-212.
- Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42: 73–91.
- DGAPFYEN. Dirección General de Política Forestal y Espacios Naturales. (2018). Participación pública del plan director de la Red Natura 2000 en Castilla-La Mancha. Viceconsejería de Medio Ambiente. Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha
- ECDC, 2017. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). *European Centre for Disease Prevention and Control*, Stockholm.
- ECHA. European Chemicals Agency (2023). European List of Notified Chemical Substances. <https://www.echa.europa.eu/information-on-chemicals/ec-inventory>
- Eduardo-Correia, B., Morales-Filloo, H., & Abad, J. P. (2020). Bacteria from the multicontaminated tinto river estuary (SW, Spain) show high multi-resistance to



antibiotics and point to *Paenibacillus spp.* as antibiotic-resistance-dissemination players. *Frontiers in Microbiology*, 3071.

European Commission (1992). Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres.

European Commission (2000). Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

European Commission (2001). Decisión nº 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. European Commission (2009). Directiva 2009/147/CE Del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 relativa a la conservación de las aves silvestres.

European Commission (2009). Directiva 2009/147/CE Del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 relativa a la conservación de las aves silvestres.

European Commission (2013). Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.

European Commission (2017). Comunicación 2017/339. Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. Plan de Acción europeo «Una sola salud» para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos.

European Commission (2022). Decisión de Ejecución 2022/1307/UE de la Comisión de 22 de julio de 2022 por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo [notificada con el número C (2022) 5098]

Fonseca, E., Hernández, F., Ibáñez, M., Rico, A., Pitarch, E., & Bijlsma, L. (2020). Occurrence and ecological risks of pharmaceuticals in a Mediterranean river in Eastern Spain. *Environment International*, 144, 106004.

Freese, H. M., Karsten, U., & Schumann, R. (2006). Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic River Warnow, northeast Germany. *Microbial Ecology*, 51, 117-127.

Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., Van der Ploeg, M., *et al.* (2015). Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3, 57-65.

Grenni, P. (2022). Antimicrobial Resistance in Rivers: A Review of the Genes Detected and New Challenges. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41, 687-714.

Griffero, L., Alcantara-Duran, J., Alonso, C., Rodriguez-Gallego, L., Moreno-Gonzalez, D., Garcia-Reyes, J. F., Perez-Parada, A., *et al.* (2019). Basin-scale monitoring and risk assessment



- of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons. *Science of the Total Environment*, 697, 134058.
- Gros, M., Petrović, M., & Barceló, D. (2007). Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro River basin (northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26, 1553-1562.
- Harnisz, M. (2013). Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment. *Environmental Pollution*, 174, 85-92.
- Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J. M., Vázquez, B. I., & Cepeda, A. (2012). Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 3235-3249.
- Lenart-Borón, A. (2017). Antimicrobial resistance and prevalence of extended-spectrum betalactamase genes in *Escherichia coli* from major rivers in Podhale, southern Poland. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 241-250.
- Li, B., & Yan, T. (2021). Next generation sequencing reveals limitation of qPCR methods in quantifying emerging antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 2925-2936.
- Llarrull, L. I., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2009). Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new β -lactams that meet the challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 4051-4063.
- Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., & Bidoglio, G. (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 157, 561-568.
- Madureira, T. V., Barreiro, J. C., Rocha, M. J., Rocha, E., Cass, Q. B., & Tiritan, M. E. (2010). Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, 408, 5513-5520.
- Makowska, N., Koczura, R., & Mokracka, J. (2016). Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. *Chemosphere*, 144, 1665-1673.
- Marti, E., Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Jofre, J., & Balcázar, J. L. (2014). Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river. *Water Research*, 61, 67-76.
- Mendoza, A., De Alda, M. L., González-Alonso, S., Mastroianni, N., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2014). Occurrence of drugs of abuse and benzodiazepines in river waters from the Madrid Region (Central Spain). *Chemosphere*, 95, 247-255.
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Liu, G., Balaram, V., Ribeiro, A. R. L., Lu, Z., *et al.* (2022). Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-28.



- Navarro, A., Sanseverino, I., Cappelli, F., Lahm, A., Niegowska, M., Fabbri, M., Lettieri, T., *et al.* (2023). Study of antibiotic resistance in freshwater ecosystems with low anthropogenic impact. *Science of The Total Environment*, 857, 159378.
- Omer, N. H. (2019). Water quality parameters. *Water Quality-Science, Assessments and Policy*, 18, 1-34.
- Osińska, A., Harnisz, M., & Korzeniewska, E. (2016). Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 10818-10831.
- Ovejero, C. M., Delgado-Blas, J. F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., & Gonzalez-Zorn, B. (2017). Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, 1050-1053.
- Pereira, A. M., Silva, L. J., Laranjeiro, C. S., Meisel, L. M., Lino, C. M., and Pena, A. (2017). Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk. *Science of the Total Environment*, 609, 1182-1191.
- Pereira, A., Santos, A., Tacão, M., Alves, A., Henriques, I., & Correia, A. (2013). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, 461, 65-71.
- Pereira, V.J, Fernandes, D., Carvalho, G., Benoliel, M.J., San Romão, M.V., Barreto Crespo, M.T. (2010). Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Research*, 44:4850-9.
- Pérez-Etayo, L., González, D., Leiva, J., & Vitas, A. I. (2020). Multidrug-resistant bacteria isolated from different aquatic environments in the North of Spain and South of France. *Microorganisms*, 8, 1425.
- Real Decreto 47/2022, de 18 de enero, sobre protección de las aguas contra la contaminación difusa producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias. «BOE» núm. 17, de 20 de enero de 2022, páginas 5664 a 5684.
- Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. «BOE» núm. 219, de 12 de septiembre de 2015, páginas 80582 a 80677.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4, 482.
- Rico, A., Arenas-Sánchez, A., Alonso-Alonso, C., López-Heras, I., Nozal, L., Rivas-Tabares, D., & Vighi, M. (2019). Identification of contaminants of concern in the upper Tagus river basin (central Spain). Part 1: Screening, quantitative analysis and comparison of sampling methods. *Science of the Total Environment*, 666, 1058-1070.
- Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2014). Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Science of the Total Environment*, 479, 247-257.



- Rodicio, M.R, & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22, 238-245.
- Romero Blasco, V. (2019). Calidad del aire exterior del Campus Tecnológico de la Fábrica de Armas (Toledo): cuantificación microbiana
- Sabri, N. A., Schmitt, H., Van der Zaan, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2020). Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8, 102245.
- Serwecińska, L., Kiedrzyńska, E., & Kiedrzyński, M. (2021). A catchment-scale assessment of the sanitary condition of treated wastewater and river water based on fecal indicators and carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* *Science of the Total Environment*, 750, 142266.
- 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, 220-227.
- Sorgen, A., Johnson, J., Lambirth, K., Clinton, S. M., Redmond, M., Fodor, A., & Gibas, C. (2021). Characterization of environmental and cultivable antibiotic-resistant microbial communities associated with wastewater treatment. *Antibiotics*, 10, 352.
- Sousa, J. M., Macedo, G., Pedrosa, M., Becerra-Castro, C., Castro-Silva, S., Pereira, M. F. R., Manaia, C. M., *et al.* (2017). Ozonation and UV254 nm radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 434-441.
- Stamatis, N., Triantafyllidis, V., Hela, D., & Konstantinou, I. (2013). Occurrence and distribution of selected pharmaceutical compounds on sewage-impacted section of River Acheloos, Western Greece. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93, 1602-1619.
- Su, S., Li, C., Yang, J., Xu, Q., Qiu, Z., Xue, B., Shen, Z., *et al.* (2020). Distribution of antibiotic resistance genes in three different natural water bodies-a lake, river and sea. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 552.
- Teixeira, P., Tacão, M., & Henriques, I. (2022). Occurrence and distribution of Carbapenem-resistant Enterobacterales and carbapenemase genes along a highly polluted hydrographic basin. *Environmental Pollution*, 300, 118958.
- Tucker, K., Mageiros, L., Carstens, A., Bröcker, L., Archer, E., Smith, K., Wolfaardt, G., *et al.* (2022). Spatiotemporal Investigation of Antibiotic Resistance in the Urban Water Cycle Influenced by Environmental and Anthropogenic Activity. *Microbiology Spectrum*, 10, e02473-22.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency (2012). Guidelines for Water Reuse. EPA/600/R-12/618.



- Valcárcel, Y., Alonso, S. G., Rodríguez-Gil, J. L., Castaño, A., Montero, J. C., Criado-Alvarez, J. J., *et al.* (2013). Seasonal variation of pharmaceutically active compounds in surface (Tagus River) and tap water (Central Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 13961412.
- Velusamy, K., Periyasamy, S., Kumar, P. S., Vo, D. V. N., Sindhu, J., Sneka, D., & Subhashini, B. (2021). Advanced techniques to remove phosphates and nitrates from waters: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 3165-3180.
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., *et al.* (2004). Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, 57, 107-126.
- Wilkinson, J. L., Boxall, A. B., Kolpin, D. W., Leung, K. M., Lai, R. W., Galbán-Malagón, C., *et al.* (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2113947119.



Anexo

Tabla A1. Lista de compuestos farmacéuticos que se han monitoreado en este trabajo.

(+)-Flecainida	Levofloxacin
(+)-Sotalol clorhidrato	Lidocaina
perclorato de 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenil-pirrolidina	Lincomicina
10,11-Epoxi carbamazepina	Mepivacaína clorhidrato
4-Androsten-3,17-diona	Metronidazol
9(10H)-Acridona	Miconazol
Ácido meclofenámico	Nicotina
Ácido mefenámico	Nifuroxazida
Ácido oxolónico	O-desmetilvenlafaxina
Acridina	Paracetamol (Acetaminofen)
Albendazol	Ranitidina
Albendazol (sulfóxido)	Roxitromicina
Antipirina	Sulfabenzamida
Atenolol	Sulfachloropiridazina
Atropina	Sulfadiazina
Bupropion	Sulfadimetoxina
Cafeína	Sulfadoxina
Carbadox	Sulfaguanidina
Carbamazepina	Sulfamerazina
Citalopram hidrobromuro	Sulfametazina
Claritromicina	Sulfametoxazol
Clenbuterol	Sulfametohipiridazina
Clotrimazol	Sulfamonometoxina
Cloxacilin	Sulfapiridina
Cotinina	Sulfaquinoxalina
Danofloxacin	Sulfatiazol
Diazepam	Sulfisoxazol
Diclofenaco	Sulpirida CRS
Difenhidrina	Telmisartán
Difenilamina	Testosterona
Enoxacina	Teobromina
Eprosartán mesilate	Teofilina
Eritromicina	Tramadol clorhidrato c-iv
Fluconazol	Tributil fosfato
Gabapentina	Trietil fosfato
Gemfibrozil	Trimetoprima
Indometacina	Valsartán
Irbesartán	Venlafaxina clorhidrato
Ketoprofeno	Verde de malaquita
Lamotrigina	



Tabla A2. Secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos de qPCR.

Gen	Secuencia forward (5' → 3')	Secuencia reverse (5' → 3')	Referencia
<i>16S</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA	(Romero Blasco, 2019)
<i>mecA</i>	ACG AGT AGA TGC TCA ATA TAA	CTT AGT TCT TTA GCG ATT GC	(Al-Talib <i>et al.</i> , 2014)
<i>blaTEM</i>	TTC CTG TTT TTG CTC ACC CAG	CTC AAG GAT CTT ACC GCT GTT G	(Sousa <i>et al.</i> , 2017)
<i>sul1</i>	CGC ACC GGA AAC ATC GCT GCA C	TGA AGT TCC GCC GCA AGG CTC G	(Su <i>et al.</i> , 2020)
<i>sul2</i>	TCA TCT GCC AAA CTC GTC GTT A	GTC AAA GAA CGC CGC AAT GT	(Su <i>et al.</i> , 2020)
<i>tetB</i>	CGA AGT AGG GGT TGA GAC GC	AGA CCA AGA CCC GCT AAT GAA	(Su <i>et al.</i> , 2020)
<i>tetC</i>	GCG GGA TAT CGT CCA TTC CG	GCG TAG AGG ATC CAC AGG ACG	(Su <i>et al.</i> , 2020)
<i>int1</i>	CCT CCC GCA CGA TGA TC	TCC ACG CAT CG TCA GGC	(Sousa <i>et al.</i> , 2017)
<i>vanA</i>	CTG TGA GGT CGG TTG TGC G	TTT GGT CCA CCT CGC CA	(Sousa <i>et al.</i> , 2017)
<i>blaKPC</i>	AAA CTG ACA CTG GGC TCT GC	TCC GGT TTT GTC TCC GAC TG	(Li & Yan, 2021)
<i>mcr-1</i>	CAA CAA CGC CAT CTG CAA CA	CGC TTA AAA TAC GCA GGC CC	(Li & Yan, 2021)
<i>qnrA</i>	AGG ATT TCT CAC GCC AGG ATT	CCG CTT TCA ATG AAA CTG CAA	(Su <i>et al.</i> , 2020)
<i>qnrB</i>	GGC ATT GAA ATT CGC CAC TG	TTT GCT GTT CGC CAG TCG AA	(Su <i>et al.</i> , 2020)
<i>qnrS</i>	GAC GTG CTA ACT TGC GTG AT	TGG CAT TGT TGG AAA CTT G	(Su <i>et al.</i> , 2020)



Tabla A3. Resultados de la caracterización de metales de las muestras del río Tajo. Los valores están expresados como concentración media ($\mu\text{g/L}$) \pm SD de tres replicados.

	<i>AEF4</i>	<i>DEF5</i>	<i>J7</i>	<i>AEÑ8</i>	<i>DEÑ9</i>	<i>ICA14</i>	<i>FCA15</i>	<i>PUS16</i>	<i>DET19</i>
Al	3501 \pm 101	3822 \pm 39	652 \pm 30	2500 \pm 51	2075 \pm 97	6071 \pm 206	8525 \pm 437	1184 \pm 25	2505 \pm 55
As	30,99 \pm 0,23	30,27 \pm 1,25	62,94 \pm 0,11	47,94 \pm 0,69	45,00 \pm 0,23	55,70 \pm 0,61	76,23 \pm 0,91	74,49 \pm 0,26	79,98 \pm 0,74
B	378 \pm 34	415 \pm 29	1108 \pm 141	683 \pm 34	726 \pm 35	991 \pm 49	959 \pm 40	976,2 \pm 7,8	997 \pm 51
Ba	261,7 \pm 4,7	264 \pm 17	191,9 \pm 3,9	239,1 \pm 6,1	234,5 \pm 5,2	292,1 \pm 4,5	439 \pm 16	302,6 \pm 7,4	329,1 \pm 6,3
Cd	0,531 \pm 0,064	0,362 \pm 0,068	0,494 \pm 0,040	3,38 \pm 0,23	0,506 \pm 0,068	0,718 \pm 0,043	0,689 \pm 0,063	0,381 \pm 0,044	0,456 \pm 0,049
Co	3,51 \pm 0,13	3,204 \pm 0,055	5,24 \pm 0,30	4,53 \pm 0,13	4,49 \pm 0,29	9,55 \pm 0,17	10,19 \pm 0,48	5,84 \pm 0,30	7,42 \pm 0,15
Cr	5,64 \pm 0,16	6,39 \pm 0,68	5,54 \pm 0,33	7,892 \pm 0,086	7,49 \pm 0,65	23,37 \pm 0,84	16,67 \pm 0,90	4,56 \pm 0,70	8,05 \pm 0,43
Cu	12,23 \pm 0,14	11,29 \pm 0,14	17,03 \pm 0,88	14,38 \pm 0,16	14,79 \pm 0,79	28,93 \pm 0,93	20,74 \pm 0,20	14,01 \pm 0,48	17,45 \pm 0,24
Fe	4406 \pm 83	4423 \pm 71	2491 \pm 112	3990 \pm 101	3849 \pm 160	8880 \pm 100	10865 \pm 450	1952 \pm 24	3587 \pm 42
Hg	0,1548 \pm 0,0023	<0,015*	0,1578 \pm 0,041	0,1567 \pm 0,0029	0,1576 \pm 0,0010	0,1567 \pm 0,0036	0,1504 \pm 0,0017	0,1563 \pm 0,0064	0,1608 \pm 0,0022
Mn	194,9 \pm 2,9	162,6 \pm 2,9	997 \pm 63	389,3 \pm 3,0	372,6 \pm 19	1444 \pm 19	1484 \pm 42	1091,7 \pm 6,1	1758 \pm 16
Mo	19,6 \pm 4,4	18,7 \pm 2,7	56,0 \pm 3,2	42,9 \pm 4,3	39,1 \pm 2,7	52,1 \pm 0,8	41,1 \pm 2,6	52,0 \pm 2,4	49,7 \pm 2,0
Ni	9,94 \pm 0,25	7,73 \pm 0,12	36,2 \pm 2,1	22,8 \pm 1,2	23,69 \pm 0,88	34,7 \pm 1,9	219,1 \pm 8,0	24,96 \pm 0,71	28,5 \pm 0,43
P	50,0 \pm 1,0	47,4 \pm 3,9	511 \pm 15	247,7 \pm 3,0	238,9 \pm 4,6	429,5 \pm 2,5	300,0 \pm 6,1	574,1 \pm 9,3	548 \pm 11
Pb	6,95 \pm 0,12	5,41 \pm 0,11	6,52 \pm 0,43	7,508 \pm 0,017	8,49 \pm 0,34	23,58 \pm 0,26	12,37 \pm 0,39	5,40 \pm 0,11	9,60 \pm 0,24
Sb	8,40 \pm 0,30	9,98 \pm 0,28	10,54 \pm 0,75	9,05 \pm 0,39	9,14 \pm 0,32	9,63 \pm 0,18	10,30 \pm 0,17	11,50 \pm 0,22	7,59 \pm 0,12
Se	3,65 \pm 0,37	3,50 \pm 0,47	3,66 \pm 0,20	4,42 \pm 0,34	4,10 \pm 0,14	4,22 \pm 0,36	2,47 \pm 0,32	3,29 \pm 0,17	2,82 \pm 0,28
Si	1604 \pm 85	1712 \pm 48	2151 \pm 288	1853 \pm 152	1964 \pm 283	1495 \pm 101	1507 \pm 53	1289 \pm 272	1324 \pm 147
U	3,722 \pm 0,034	3,669 \pm 0,027	8,49 \pm 0,43	5,977 \pm 0,050	7,07 \pm 0,26	10,16 \pm 0,11	8,12 \pm 0,34	9,803 \pm 0,071	9,56 \pm 0,19
Zn	29,0 \pm 2,1	10,9 \pm 1,2	88,6 \pm 9,1	57,5 \pm 1,4	60,5 \pm 4,8	147,2 \pm 4,3	883 \pm 26	31,3 \pm 2,9	47,8 \pm 3,1

Al (aluminio), As (arsénico), B (boro), Ba (bario), Cd (cadmio), Co (cobalto), Cr (cromo), Cu (cobre), Fe (hierro), Hg (mercurio), Mn (manganeso), Mo (molibdeno), Ni (níquel), P (fósforo), Pb (plomo), Sb (antimonio), Se (selenio), Si (silicio), U (uranio), Zn (zinc).

*Límite de cuantificación.



Tabla A4. Recuento microbiológico de bacterias en TSA y en TSA con los diferentes antibióticos en los puntos de muestreo. Los valores están expresados como concentración media (UFC/100 mL) \pm SD de dos replicados.

	TSA	TSA con Ampicilina	TSA con Doxiciclina	TSA con Sulfametoxazol	TSA con Ciprofloxacina
<i>AEF4</i>	$1,55 \times 10^5 \pm 4,95 \times 10^4$	$4,50 \times 10^3 \pm 2,12 \times 10^3$	n.d.	$1,70 \times 10^3 \pm 2,83 \times 10^2$	n.d.
<i>DEF5</i>	$9,00 \times 10^4 \pm 2,83 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^2$	n.d.	$1,55 \times 10^3 \pm 6,36 \times 10^2$	n.d.
<i>J7</i>	$2,60 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4 \pm 7,07 \times 10^3$	$2,20 \times 10^2 \pm 2,83 \times 10^1$	$4,55 \times 10^3 \pm 2,12 \times 10^2$	$7,50 \times 10^1 \pm 7,07$
<i>AEÑ8</i>	$2,50 \times 10^5 \pm 1,23 \times 10^3$	$2,50 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^3$	$6,45 \times 10^3 \pm 1,48 \times 10^3$	$3,65 \times 10^3 \pm 9,19 \times 10^2$	$1,50 \times 10^1 \pm 7,07$
<i>DEÑ9</i>	$3,55 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4 \pm 2,83 \times 10^3$	$4,85 \times 10^3 \pm 2,12 \times 10^2$	$4,55 \times 10^3 \pm 2,12 \times 10^2$	$5,00 \times 10^1 \pm 1,41 \times 10^1$
<i>ICA14</i>	$4,35 \times 10^6 \pm 4,95 \times 10^5$	$2,05 \times 10^4 \pm 7,07 \times 10^2$	$8,00 \times 10^1 \pm 1,41 \times 10^1$	$1,09 \times 10^4 \pm 1,06 \times 10^3$	$7,00 \times 10^1 \pm 1,41 \times 10^1$
<i>FCA15</i>	$2,45 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^4$	$9,50 \times 10^3 \pm 2,12 \times 10^3$	$4,00 \times 10^1 \pm 1,41 \times 10^1$	$1,00 \times 10^3 \pm 1,41 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2 \pm 4,24 \times 10^1$
<i>PUS16</i>	$9,50 \times 10^5 \pm 2,12 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^3$	n.d.	$4,90 \times 10^3 \pm 1,41 \times 10^2$	$2,50 \times 10^1 \pm 7,07$
<i>DET19</i>	$2,05 \times 10^6 \pm 6,36 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5 \pm 7,78 \times 10^3$	n.d.	$4,70 \times 10^3 \pm 9,90 \times 10^2$	$6,00 \times 10^1 \pm 1,41 \times 10^1$

*n.d.: no detectado.



Tabla A5. Recuento microbiológico de bacterias y hongos en los distintos puntos de muestreo. Los valores están expresados como concentración media (UFC/100 mL) \pm SD de dos replicados.

	R2A	Acinetobacter	Coliformes totales	E. coli	Hongos
<i>AEF4</i>	$1,45 \times 10^5 \pm 2,12 \times 10^4$	$6,00 \times 10^2 \pm 1,41 \times 10^2$	$2,80 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^3$	$7,00 \times 10^2 \pm 5,25 \times 10^1$	$8,50 \times 10^1 \pm 7,07$
<i>DEF5</i>	$9,00 \times 10^4 \pm 2,83 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3 \pm 1,41 \times 10^2$	$2,50 \times 10^4 \pm 7,07 \times 10^3$	n.d.	$1,10 \times 10^2 \pm 1,41 \times 10^3$
<i>J7</i>	$3,60 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^4$	$2,50 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^2$	$3,00 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3 \pm 2,5 \times 10^2$	$7,00 \times 10^2 \pm 7,07 \times 10^1$
<i>AEÑ8</i>	$4,40 \times 10^5 \pm 1,56 \times 10^5$	$5,50 \times 10^3 \pm 2,12 \times 10^3$	$5,50 \times 10^4 \pm 7,07 \times 10^3$	$4,40 \times 10^3 \pm 2,5 \times 10^2$	$7,50 \times 10^2 \pm 2,12 \times 10^2$
<i>DEÑ9</i>	$3,95 \times 10^5 \pm 4,95 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^2$	$4,85 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^3$	$4,12 \times 10^3 \pm 2,5 \times 10^2$	$1,20 \times 10^3 \pm 2,83 \times 10^2$
<i>ICA14</i>	$1,39 \times 10^6 \pm 1,91 \times 10^5$	$6,00 \times 10^3 \pm 1,41 \times 10^2$	$9,50 \times 10^5 \pm 4,95 \times 10^5$	$1,45 \times 10^4 \pm 1,01 \times 10^3$	$4,50 \times 10^1 \pm 7,07$
<i>FCA15</i>	$2,90 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^4$	$1,45 \times 10^3 \pm 4,95 \times 10^2$	$1,95 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^3$	n.d.	$4,85 \times 10^2 \pm 6,36 \times 10^1$
<i>PUS16</i>	$5,65 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^4$	$6,35 \times 10^4 \pm 7,07 \times 10^2$	$3,75 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^3$	n.d.	$1,25 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^1$
<i>DET19</i>	$5,15 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4 \pm 4,24 \times 10^3$	$3,20 \times 10^5 \pm 2,83 \times 10^4$	$1,92 \times 10^4 \pm 1,01 \times 10^3$	$1,55 \times 10^3 \pm 7,07 \times 10^1$

*n.d.: no detectado.