



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**RESISTENCIAS A DIFERENTES
ANTIMICROBIANOS EN CEPAS
BACTERIANAS PROCEDENTES DE
PESCADO**

PRESENTADA POR:
JOSÉ LUIS ROMERO GARCÍA

DIRIGIDA POR:
DR. D.^a ROSARIO LUCAS LÓPEZ
DR. D.^a MARÍA JOSÉ GRANDE BURGOS
DR. D. ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO

JAÉN, 13 DE DICIEMBRE DE 2017

ISBN 978-84-9159-140-5

RESISTENCIA A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS EN CEPAS BACTERIANAS PROCEDENTES DE PESCADO

Memoria para optar al grado de Doctor
Jaén, Octubre de 2017

Fdo.: José Luis Romero García
Aspirante al Grado de Doctor

Los Directores del trabajo:

Fdo.: Rosario Lucas López Fdo: María José Grande Burgos

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud.
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

Los directores de tesis **D^a. Rosario Lucas López, D^a. María José Grande Burgos y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz**, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

HACEN CONSTAR: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Resistencias a diferentes antimicrobianos en cepas bacterianas procedentes de pescado”** presentado por **D. José Luis Romero García** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor.

Jaén, Octubre de 2017

Fdo.: Rosario Lucas López

Fdo.: María José Grande Burgos

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía), el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (Estructura AGR230), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3).

I.-RESUMEN	1
II.- INTRODUCCIÓN	7
II.1.- IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR DE LA PESCA	9
II.2.- MICROBIOLOGÍA DEL PESCADO	15
II.2.1.- Alteración y contaminación del pescado	17
II.2.2.- Microbiología de la tilapia	18
II.3.- RESISTENCIAS A AGENTES ANTIMICROBIANOS	20
II.3.1.- Resistencia a biocidas	25
II.3.1.1.- Tipos de biocidas	26
II.3.1.2.- Propiedades deseables de un biocida	28
II.3.1.3.- Clasificación de según su función química	29
II.3.1.4.- Mecanismos de resistencia a biocidas	39
II.3.2.- Resistencia a antibióticos	42
II.3.2.1.- Historia de los antibióticos	43
II.3.2.2.- Mecanismos de resistencias a antibióticos	45
II.3.3.- Resistencia a metales pesados	48
II.3.3.1.- Determinantes genéticos de resistencia a metales pesados	50
III.- OBJETIVOS	55
IV.- TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	59
IV.1.- Artículo 1: Resistencias a biocidas de cepas aisladas de diferentes pescados	61
IV.2.- Artículo 2: Resistance to antibiotics, biocides, preservatives and metals in bacteria isolated from seafoods: co-selection of strains resistant or tolerant to different classes of compounds	83

IV.3.- Artículo 3: Analysis of potential risks from the bacterial communities associated with air-contact surfaces from tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) fish farming	101
V.- DISCUSIÓN GENERAL	109
VI.- CONCLUSIONES	123
VII.- REFERENCIAS	129

RESUMEN

Las infecciones por consumo de alimentos contaminados continúan siendo una constante relevante en el ámbito sanitario de la Unión Europea. Una preocupación creciente en el sector pesquero es el aumento de cepas resistentes o multirresistentes a los agentes antimicrobianos en la cadena alimentaria.

En el presente trabajo se ha aislado una colección de cepas de diferentes muestras de pescado fresco, y se ha determinado la resistencia a diferentes biocidas. En la mayoría de los productos de la pesca estudiados, la carga microbiana (aerobios mesófilos totales) estaba comprendida entre 10^3 y 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo. En el estudio morfológico predominan los bacilos Gram-negativas, salvo en productos donde la manipulación ha sido más importante que encontramos cocos Gram-positivos. Respecto a los ensayos de resistencia a biocidas, en los que hay mayor número de cepas resistentes son: triclosán, oxonia, cloruro de benzalconio y hexadecilpiridinio. Destaca el porcentaje de cepas resistentes procedentes de productos de pesca extractiva y de acuicultura a la concentración de corte de 0,025%.

Las bacterias resistentes a múltiples fármacos (particularmente aquellas que producen β -lactamasas de amplio espectro) se han convertido en un importante problema para la salud. La exposición continua a antibióticos, biocidas, conservantes químicos y metales en diferentes entornos como la cadena alimentaria o en el medio ambiente puede dar lugar al desarrollo de múltiples resistencias o corresistencias. El objetivo del estudio fue determinar la presencia de resistencias múltiples (biocidas, antibióticos, conservantes químicos, compuestos fenólicos y metales) en aislados bacterianos de diferentes pescados. Un 75,86% de los 87 aislados estudiados eran resistentes al menos a un antibiótico o a un biocida y el 6,90% mostraban resistencia múltiple, al menos a tres de los biocidas ensayados y por lo menos a tres de los antibióticos. Se detectaron correlaciones significativamente ($P < 0,05$) positivas moderadas o fuertes entre las cepas tolerantes a biocidas y antibióticos, y entre antibióticos con biocidas y otros antimicrobianos. Posteriormente se identificaron mediante la secuenciación del 16S rDNA, 30 de los aislados seleccionados de acuerdo con su perfil de resistencia antimicrobiana y el tipo de alimento, y se ensayó la tolerancia frente a cobre y zinc. Se estudiaron los determinantes genéticos de tolerancia a los biocidas y los metales y la resistencia a los antibióticos. Los aislados seleccionados fueron identificados como *Pseudomonas* (63,33%), *Acinetobacter* (13,33%),

Aeromonas (13,33%), *Shewanella*, *Proteus* y *Listeria* (un aislado cada uno). Los determinantes de resistencia a antibióticos detectados incluyeron *sul1* (43,33% de los aislados ensayados), *sul2* (6,66%), *bla*_{TEM} (16,66%), *bla*_{CTX-M} (16,66%), *bla*_{PSE} (10,00%), *bla*_{IMP} (3,33%), *bla*_{NDM-1} (3,33 %), *floR* (16,66%), *aadA*₁ (20,0%) y *aac* (6 ') -*Ib* (16,66%). El único determinante de resistencia a biocidas detectado entre los aislados seleccionados fue *qacEΔ1* (10,00%). Un 23.30% de las cepas seleccionadas fueron capaces de crecer en un medio de cultivo que contenía sulfato de cobre a una concentración de 32 mM, y el 46.60% a una concentración de 8 mM de cloruro de zinc. Se detectaron los genes de resistencia a metales *pcoA/copA*, *pcoR*, y *chrB* en 36,66, 6,66 y 13,33% de los aislados seleccionados respectivamente. Doce de las muestras dieron positivo para genes de resistencia a metales y a antibióticos, incluyendo un aislado positivo para el gen *bla*_{NDM-1} de carbapenemasa y para *pcoA/copA*. Estos resultados sugieren que la exposición a los metales podría co-seleccionar la resistencia a los antibióticos y también destacar el potencial de las bacterias en los pescados a participar en la transmisión de genes de resistencia a los antimicrobianos.

El cultivo de tilapia es un sector creciente y prometedor en acuicultura. Sin embargo, hay estudios escasos en microbiología sobre los riesgos asociados a las granjas de tilapia. El objetivo del presente estudio fue analizar las comunidades bacterianas de superficies sólidas en contacto con el aire en una granja de tilapia para evaluar la presencia de bacterias potencialmente toxinógenas o patógenas para humanos o animales. Se tomaron muestras de una granja local de tilapia (pared del tanque, aireador, tomas de agua, fregadero y suelo) y se analizaron mediante tecnología de secuenciación masiva del 16S rDNA. Las secuencias fueron asignadas a Unidades taxonómicas operativas (OTUs). El filo *Proteobacteria* fue el mayor representado en la mayoría de las muestras (exceptuando una). Las cianobacterias fueron el filo relevante en la pared interna del estanque de engorde y en el sifón del tanque de pre-engorde. *Bacteroidetes* fue el segundo filo en proporción para las muestras del tanque de cría de larvas y en el tanque de pre-engorde, y una muestra del tanque de engorde. Las fusobacterias mostraron porcentajes más altos en las muestras procedentes del tanque de cría de larvas y en el tanque de pre-engorde. Otros filos (*Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Gemmatimonadetes* o *Fibrobacters*) tuvieron menor abundancia relativa. Una gran parte de las lecturas (que van del 43.67% al 72.25%) fueron asignadas a bacterias no

cultivables. El género *Acinetobacter* (principalmente *A. calcoaceticus/baumanni*) fue la OTU predominante en el aireador del tanque de engorde y también en el fregadero cercano al suelo. Los géneros *Cetobacterium* y *Bacteroides* mostraron una alta proporción en las muestras del tanque de cría de larvas y el tanque de pre-engorde. Los géneros en los que se incluyen los patógenos de los peces como *Fusobacterium* y *Aeromonas*, solo se detectaron en pequeñas proporciones. No se detectaron patógenos humanos distintos de *Acinetobacter* o tuvieron abundancias relativas muy bajas ($<0,01\%$). Los resultados del estudio sugieren que los principales factores de riesgo a controlar en la granja de tilapia son las cepas patógenas de *Acinetobacter* y posibles cianobacterias productoras de cianotoxinas.

INTRODUCCIÓN

II.1.- IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR DE LA PESCA.

Los peces y sus productos derivados constituyen una importante fuente de proteína de alto valor biológico, de grasas saludables y vitaminas liposolubles.

Debido al incremento de la población mundial y a la mejora de los índices de desarrollo de muchos países, la producción de alimentos proteicos experimenta una demanda creciente. El total mundial de la producción de la pesca de captura y acuicultura en 2014 fue de 167,2 millones de toneladas. La producción pesquera, supone el tercer alimento proteico de origen animal en cantidad bruta después de la leche y la carne y el segundo en el aporte de proteína neta después de la carne (FAO, 2013). Desde 1980 hasta 2014 se ha incrementado la producción mundial de pescado en una tasa media anual del 2,5 %, similar a la producción de carne. Este incremento se debe al gran auge de la acuicultura con una tasa media anual del 8,4 % mientras que el pescado procedente de las capturas solo se ha visto incrementado en un 1,0 % (Tabla 1) (FAO, 2014).

Tabla 1. Evolución de la producción mundial de alimentos proteicos de origen animal entre 1980, 2000 y 2014 (en millones de toneladas). Fuente: FAO, 2014.

	1980	2000	2014	% de incremento medio anual 1980-2014
LECHE	465,8	579,3	801,6	1,6 %
CARNE	136,7	229,5	317,9	2,5 %
HUEVOS	27,4	55,0	75,5	3,0 %
PESCADO(*) (Total)	71,9	125,9	167,2	2,5 %
PESCADO (*) (Capturas)	67,2	93,5	93,4	1,0 %
PESCADO (*) (Acuicultura)	4,7	32,4	73,8	8,4 %

(*) Se incluye la producción mundial de pescado, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos

La producción pesquera mundial en 2014, incluyendo las capturas y acuicultura de peces, crustáceos y moluscos está muy concentrada en países de Asia, destacando la producción de China con más de 62 millones de toneladas y a gran distancia del resto de países. Tan solo países como Estados Unidos, Perú, la Federación Rusa, Noruega y Chile se acercan a las producciones de los países asiáticos. España se sitúa en el puesto número 20 con 1,4 millones de toneladas, superada solamente por Noruega y Egipto a nivel Europeo y de la zona mediterránea. En la tabla 2 se resumen los datos de producción de los 20 primeros países a nivel mundial. Estos 20 primeros países concentran el 82 % de la producción mundial (el 74 % de las capturas y el 94 % de la acuicultura).

Tabla 2. Producción pesquera mundial. Fuente: FAO 2014.

PRODUCCIÓN PESQUERA MUNDIAL, POR CAPTURA Y ACUICULTURA, POR PAÍS 2014				
	PECES, CRUSTÁCEOS Y MOLUSCOS (En Toneladas)			
PUESTO N°	PAÍS	CAPTURA	ACUICULTURA	TOTAL
1	China	17.106.547	45.468.960	62.575.507
2	Indonesia	6.436.715	4.253.896	10.690.611
3	India	4.718.821	4.881.019	9.599.840
4	Vietnam	2.919.200	3.397.064	6.316.264
5	Estados Unidos	4.975.947	425.870	5.401.817
6	Myanmar	4.083.270	962.156	5.045.426
7	Federación Rusa	4.225.556	161.214	4.386.770
8	Japón	3.680.966	657.000	4.337.966
9	Perú	3.573.371	120.384	4.190.008
10	Noruega	2.301.609	1.332.947	3.634.556
11	Bangladesh	1.591.190	1.968.925	3.560.115
12	Chile	2.175.488	1.214.523	3.390.011
13	Filipinas	2.350.888	788.029	3.138.917
14	Tailandia	1.769.546	934.758	2.704.304
15	Rep. De Corea	1.727.643	480.394	2.208.037
16	Malasia	1.464.071	275.682	1.739.753
17	México	1.519.893	194.224	1.714.117
18	Egipto	344.791	1.137.091	1.481.882
19	Taiwán	1.068.278	339.609	1.407.887
20	España	1.109.537	282.238	1.391.775
	SUMA:	69.143.327	69.275.983	138.419.310
	% DEL TOTAL MUNDIAL:	74%	94%	82%
	TOTAL MUNDIAL:	93.445.234	73.783.725	167.228.959
	CHINA, % DEL TOTAL MUNDIAL:	18%	62%	37%

El crecimiento de las capturas en 2014 fue bajo, un 0,8 % en comparación con el año anterior, la producción mundial a nivel de capturas fue estable. Sin embargo, se produce un incremento elevado en la producción acuícola en los últimos 15 años, destacando China, seguida de Indonesia, India y Vietnan.

El aumento del suministro mundial de pescado para consumo humano ha superado al crecimiento de la población en los últimos cinco decenios, aumentando a un ritmo anual medio del 3,2% en el período 1961-2013, el doble que el ritmo de crecimiento demográfico, lo que ha dado lugar a un aumento de la disponibilidad media *per capita*. El consumo aparente de pescado *per capita* a nivel mundial registró un aumento de un promedio de 9,9 Kg en la década de 1960 a 14,4 Kg en la década de 1990 y 19,7 Kg en 2013. En 2013 el suministro *per capita* de peces comestibles en el mundo es de 19,7 Kg que si exceptuamos China se queda en 15,3 Kg, el de China es de 37,9 Kg, en otras zonas del mundo es de 9,8 Kg en África, 21,4 Kg en América del Norte, 9,4 Kg en América Latina y Caribe, 23,0 Kg en Asia, 24,8 Kg en Oceanía y 22,2 Kg en Europa (FAO, 2016).

El consumo de pescado en España es uno de los más elevados a nivel mundial. Según datos de la FAO de 2013, la disponibilidad para consumir *per capita* fue de 42,4 Kg anuales, frente a una media europea de 21,9 Kg y media mundial de 19,7 Kg. El balance entre importaciones y exportaciones también nos indica que se realiza un comercio importante de pescado en España, en 2013 las importaciones fueron de 1.901.609 toneladas y las exportaciones de 1.108.074 toneladas (FAO, 2016).

Además del aumento de la producción, otros factores que han contribuido a aumentar el consumo son: la reducción del despilfarro, la mejora de la utilización, el fomento de los canales de distribución y la demanda cada vez mayor asociada al crecimiento demográfico como son el aumento de los ingresos y la urbanización. Este crecimiento significativo del consumo de pescado ha mejorado las dietas de las personas en todo el mundo gracias a alimentos diversificados y nutritivos. En 2013, el pescado representó alrededor del 17% de la ingestión de proteínas animales de la población mundial y el 6,7% de las proteínas consumidas en total. Además de ser una fuente rica en proteínas de alta calidad y fácil digestión que contiene todos los aminoácidos indispensables, el pescado proporciona grasas esenciales como ácidos grasos omega 3

de cadena larga, vitaminas D, A y B y minerales como calcio, yodo, zinc, hierro y selenio (FAO, 2016)

En 2014, el 46% del pescado destinado al consumo humano directo era pescado vivo, fresco o refrigerado. El resto de la producción para fines alimentarios se procesó de diferentes formas: alrededor del 12% seco, salado, ahumado o curado; el 13% elaborado o en conserva y el 30% congelado (FAO, 2016).

El comercio internacional desempeña un papel importante en el sector de la pesca y acuicultura al crear empleo, proveer de alimentos, generar ingresos y contribuir al crecimiento y desarrollo económicos, así como a la seguridad alimentaria y nutricional. El pescado y los productos pesqueros representan uno de los segmentos más comercializados del sector alimentario mundial; se estima que alrededor del 78% de los productos marinos está expuesto a la competencia comercial internacional (FAO, 2016).

China es el principal productor de pescado y el mayor exportador de pescado y productos pesqueros. También es un importador considerable debido a la externalización de elaboración con otros países, así como al creciente consumo interno de especies que no se producen en el país. Noruega es el segundo mayor exportador, registrando valores máximos de exportación en 2015. En 2014 y 2015 la Unión Europea, fue con diferencia, el mayor mercado único de pescado y productos pesqueros importados, seguida de los Estados Unidos de América y el Japón (FAO, 2016).

La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) y el acuerdo de París de la Conferencia de las Partes (COP21) de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático deberían ejercer una fuerte influencia sobre la gobernanza de la pesca y la acuicultura. Los 17 ODS y sus 169 metas proporcionan un marco para guiar las medidas en materia de desarrollo de gobiernos, organismos internacionales, la sociedad civil y otras instituciones durante los siguientes 15 años con el ambicioso propósito de erradicar la pobreza extrema y el hambre. La seguridad alimentaria y la nutrición, y la gestión y utilización sostenibles de los recursos naturales, ocupan un lugar destacado en los ODS y las metas, que se aplican a todos los países e integran las tres dimensiones del desarrollo sostenible (económica, social y ambiental). Así mismo en el Acuerdo de París se reconoce que el

cambio climático constituye una grave amenaza para la seguridad alimentaria, el desarrollo sostenible y la erradicación de la pobreza en el mundo. Por lo tanto, la gobernanza debe garantizar que la pesca y la acuicultura se adapten a las repercusiones del cambio climático y mejoren la resiliencia de los sistemas de producción de alimentos” (FAO, 2016)

En la figura 1 y en la tabla 3 se muestran las principales áreas de pesca del mundo.

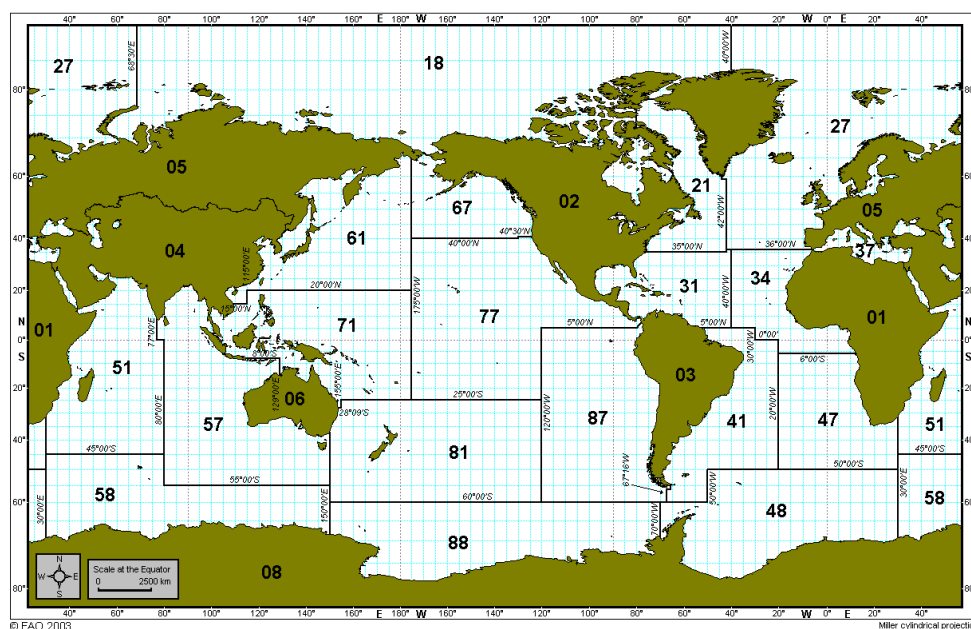


Figura 1.- Áreas principales de pesca del mundo.

Tabla 3. Áreas principales de pesca del mundo.

Código	
AGUAS CONTINENTALES	AGUAS CONTINENTALES
01	África - Aguas continentales
02	América del Norte - Aguas continentales
03	América del Sur - Aguas continentales
04	Asia - Aguas continentales
05	Europa - Aguas continentales
06	Oceanía - Aguas continentales
07	(Área de la ex URSS – Aguas continentales)
08	Antártida - Aguas continentales
AREAS MARÍTIMAS	ÁREAS MARÍTIMAS
	Océano Atlántico y mares adyacentes
18	Mar Ártico
21	Atlántico, noroeste
27	Atlántico, nordeste
31	Atlántico, centro-occidental
34	Atlántico, centro-oriental
37	Mediterráneo y mar Negro
41	Atlántico, sudoccidental
47	Atlántico, sudoriental
	Océano Índico
51	Océano Índico, occidental
57	Océano Índico, oriental
	Océano Pacífico
61	Pacífico, noroeste
67	Pacífico, nordeste
71	Pacífico, centro-occidental
77	Pacífico, centro-oriental
81	Pacífico, sudoccidental
87	Pacífico, sudoriental
	Océano Austral
48	Atlántico, Antártico
58	Océano Índico, Antártico
88	Pacífico, Antártico

II.2.- MICROBIOLOGÍA DEL PESCADO

La piel de los peces, al igual que la de los demás vertebrados, se compone de dos capas: la epidermis y la dermis. La consistencia de la piel influye en la capacidad de conservación del pescado y sobre su sabor. Después de la muerte se produce la diseminación de la microbiota bacteriana a partir de la piel y una rápida descomposición del pescado. La piel contiene abundantes microorganismos resistentes a bajas temperaturas, que incluso crecen a temperatura menor de -10 °C. Las bacterias existentes en el intestino contribuyen junto con las de la piel a la descomposición del pescado (Ruiter, 1999).

La vida útil de los productos de la pesca depende de la rapidez con la que se produzca el deterioro después de la muerte. Este producto es muy perecedero debido a los siguientes factores: características físico-químicas de la matriz, alta actividad agua, pH neutro, su composición lipídica, enzimas autolíticas y microorganismos en la superficie corporal (Forythe y Hayes, 1999). Además todos estos factores son dependientes de la temperatura, un control estricto de la temperatura es obligado y a pesar de ello la flora microbiana está adaptada y puede crecer a temperaturas bajas. Las operaciones de evisceración y fileteado realizadas con unas correctas prácticas higiénicas ayudan a prolongar la vida útil. Las reacciones enzimáticas acaban produciendo reblandecimiento de la textura y olores y sabores extraños. Los peces son animales poiquiloterms, por tanto, la flora predominante refleja mucho la del medio que circunda al pez vivo (Abaroa et al., 2008). El hecho de sacar los peces del agua, seguido de su muerte y almacenamiento en hielo, supone que la flora microbiana contaminante debe adaptarse a un medio distinto.

La microbiota de los peces de aguas frías de las regiones árticas y templadas consiste fundamentalmente en psicrófilos aerobios Gram-negativos y psicrotrofos. La microbiota externa del pescado pertenece a los siguientes géneros Gram-negativos: *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* y *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium* y *Cytophaga* y también algún Gram-positivos, como *Micrococcus* y corineformes (Gram y Huss, 1996). En los intestinos predominan el género *Vibrio* y en menor medida *Clostridium*. La mayor parte son psicrófilos, capaces de crecer a temperaturas de hasta -5 °C o -6 °C. Por tanto, aunque están inicialmente en cantidades

bastante pequeñas, pueden crecer rápido durante su almacenamiento en frío para alcanzar cifras de 10^5 a 10^7 UFC/g (de tejido branquial), en 7 días.

La microbiota inicial del pescado depende del ambiente y de su entorno en el momento de la pesca. Se modifica según la capacidad de los microorganismos de multiplicarse en los subambientes que constituyen las superficies de la piel, agallas y tracto digestivo. El marisco recogido cerca de áreas urbanas tiene mayor carga microbiana y más diversa que si es de zonas alejadas. El tejido muscular de peces y mariscos sanos y recién capturados es normalmente estéril, la flora microbiana la encontraremos en la piel, caparazón quitinoso, agallas y tracto intestinal. Las labores de captura del pescado pueden dañar la piel o producir aplastamiento que faciliten la contaminación del tejido muscular. Los recuentos microbianos varían dependiendo de las condiciones del agua y de la temperatura.

La microbiota de peces vivos de aguas frías y templadas es muy constante, predominando Gram-negativos como: *Psychrobacter* (*Moraxella*), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella* (*Alteromonas*), *Flavobacterium*, *Cytophaga* y *Vibrio*. Normalmente hay un pequeño número de Gram-positivos como *Micrococcus* y *Corynebacterium*. En aguas cálidas, entre el 50 y 60 % de la microbiota es Gram-positiva, de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* (Abaroa et al., 2008). En la piel y agallas predominan las bacterias aerobias facultativas, encontrando bacterias del género *Vibrio*, en peces pelágicos (caballa, arenque, sardina, etc.) en concentraciones elevadas. En intestino abundan anaerobias obligadas. En los pescados de agua dulce hay los mismos tipos de bacterias, salvo que *Aeromonas* sustituye a *Vibrio*.

En crustáceos vivos, encontramos Gram-negativos como *Psychrobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*; *Pseudomonas* en menor proporción que en pescados vivos. Igualmente a Gram-positivos como *Micrococcus* y *Corynebacterium*. En moluscos vivos, predomina *Vibrio*, sobre todo en ostras. También Gram-positivos como *Bacillus* y *Micrococcus*. Al vivir en ambientes costeros puede haber bacterias procedentes de efluentes humanos de las familias de las *Enterobacteriaceae* y *Streptococcaceae*. En pescados y mariscos además de bacterias podemos encontrar levaduras (*Rhodotorula*, *Torulopsis* y *Candida*) en número mucho menor que bacterias

y ocasionalmente mohos, sobre todo en aguas dulces de estuarios, en salmónidos debilitados y hongos quitinosos en cangrejos.

II.2.1.- Alteración y contaminación del pescado

Los olores más propios del pescado alterado son el resultado de la utilización bacteriana de moléculas relativamente pequeñas e hidrosolubles del tejido del pescado, especialmente de los constituyentes del nitrógeno no proteico de los tejidos del pescado: aminoácidos, péptidos pequeños y óxido de trimetilamina (Ruiter, 1999). Otros productos del metabolismo bacteriano que contribuyen a la percepción sensorial de la alteración son: ácidos grasos de cadena corta (ácido láctico, ácido butírico), aldehídos y cetonas de los lípidos tisulares, sulfuros volátiles (sulfuro de hidrógeno, dimetil-sulfuro, metil-mercaptano), aminas (indol, escatol), aminas biógenas (histamina, putrescina y cadaverina) y amoníaco procedente de los aminoácidos o proteínas degradadas (Ibrahim et al., 2008). La producción bacteriana de enzimas con actividad proteinasa está reprimida al principio pero se acelera en las últimas fases debido al aumento en el *pool* de aminoácidos procedentes de la hidrólisis de proteínas.

Los microorganismos patógenos del pescado crudo refrigerado, al final de su procesado inicial, son los mismos que la microbiota original y los adquiridos en las primeras fases de la pesca. En pescado entero hay *Clostridium botulinum*, tipos E y B y F no proteolíticos. Pueden crecer a temperaturas bajas, a partir de 3,3 °C, por tanto hay que tener cuidado con pescado envasado al vacío y en atmósferas modificadas mantenido a una temperatura mayor de 3 °C. En los pescados que no se cuide la cadena de frío y se mantengan a una temperatura mayor de 10 °C crecen bien microorganismos patógenos como: *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp.

En aguas cálidas puede haber altos recuentos de *Vibrio* spp. Dentro de este grupo pueden producir septicemias graves: *V. alginolyticus*, *V. cholerae* (no O1), *V. parahaemolyticus* y si la persona tiene diabetes o cirrosis *V. vulnificus* puede ser peligroso. Ocasionalmente también podemos encontrar *V. mimicus*, *V. hollisae* y *V. furnisii*. En las truchas criadas en estanques puede haber altas concentraciones de *C. botulinum*. Pueden aparecer patógenos entéricos (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.) en

balsas enriquecidas con estiércol y también debido a los piensos, anfibios y aves. En ahumados puede presentarse *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*, y *C. botulinum*. Si la temperatura no ha sido suficientemente alta y hay una mala conservación a temperatura alta puede dar problemas *C. botulinum* tipo E. En el proceso de ahumado en caliente se inactivan esporas de *C. botulinum* no proteolítico pero no las proteolíticas (Gram y Huss, 1996).

La vida útil de los productos pesqueros ahumados depende en gran medida de la contaminación bacteriana inicial de la materia prima; de la disminución de la actividad de agua (aw) de los tejidos, de la activación de la microflora causante de putrefacción debido al tratamiento térmico; de la cantidad de componentes de humo que penetran el producto y de los niveles de temperatura, humedad del aire y de oxígeno durante el almacenamiento (Ibrahim et al., 2008).

Las infecciones por consumo de alimentos contaminados continúan siendo una constante relevante en el ámbito sanitario de la Unión Europea. De acuerdo con el informe de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA-ECDC, 2013a), en 2011 se detectaron un 16.1% de infecciones por consumo de diferentes pescados el ámbito de la Unión Europea.

II.2.2.- Microbiología de La tilapia

La tilapia es un producto alimenticio de acuicultura de gran importancia económica y mundial (Rafael, 2008). En 2014, la producción acuícola mundial de tilapia y otros cíclidos ascendió a 5308020 toneladas (FAO, 2014). En España, el cultivo de tilapia sigue siendo muy limitado, pero se espera que el sector aumente en un futuro próximo (FAO, 2017). El cultivo de tilapia genera un ambiente antropogénico en el que se desarrollan diferentes comunidades microbianas. Estudiar la composición de las comunidades bacterianas en los ecosistemas acuícolas puede ser interesante para poder evaluar la inocuidad de los alimentos, estudiar el riesgo de exposición a patógenos humanos y así poder adoptar medidas de control destinadas a disminuir la propagación de posibles bacterias patógenas.

Un estudio sobre bacterias asociadas con el cultivo de tilapia (agua de estanque, sedimento de estanques, branquias e intestino de pescado) basado en métodos dependientes de cultivo (Pakingking et al., 2015) reveló que *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* spp. y *Vibrio cholerae* fueron las bacterias dominantes identificadas en las branquias e intestinos de la tilapia. Estas bacterias también se encontraron en el sedimento del estanque y en el agua de cría, exceptuando *S. putrefaciens* y *V. cholerae* en las muestras de agua examinadas. Estos datos confirmaban que las bacterias presentes en el agua y sedimento del estanque coincidían con la composición de la microbiota bacteriana encontrada en las branquias e intestinos de tilapia y que bajo condiciones de estrés pueden producir enfermedades contagiosas (Pakingking et al., 2015).

Los estudios basados en tecnologías de secuenciación masiva (HTS, por sus siglas en inglés) están proporcionando una nueva visión de la microbiota de diferentes ambientes, incluyendo peces y granjas de peces. Al estudiar las comunidades del bacterioplancton de los estanques de tilapia, Fan et al. (2016) concluyeron que los filo dominantes en todas las muestras de agua eran similares, incluyendo *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes* y *Chlorobi*, distribuidas en distintas proporciones en los diferentes meses y estanques. Un estudio sobre la composición de comunidades de bacterias de agua, piensos y tracto digestivo de larvas de tilapia del Nilo, reveló la presencia de representantes de *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Nitrospirae* y *Planctomycetes* a diferentes porcentajes dependiendo del ambiente de muestreo investigado (Giatsis et al., 2015). Otro estudio analizó la microbiota intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) después de la aplicación de un probiótico multi-especies. *Firmicutes* fue el filo dominante en el grupo control, mientras que *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Nitrospirae*, *Spirochaetes* y el filum TM6 se detectaron en menor proporción (Standen et al., 2015).

Mientras que la microbiota del agua, los estanques y el intestino de la tilapia se han estudiado en gran parte, no hay estudios previos sobre las comunidades bacterianas de las superficies húmedas en contacto con el aire, donde los biofilms bacterianos pueden desarrollarse. Tales entornos podrían ser una fuente de bacterias patógenas o

toxinógenas. Los biofilms son estructuras complejas donde las bacterias están incrustadas dentro de una matriz extracelular producida por ellas mismas (Costerton et al., 1999, Donlan y Costerton, 2002). La formación de biofilm confiere una mayor tolerancia a los procesos de desinfección, lo que facilita la persistencia de bacterias en el medio ambiente (Donlan y Costerton, 2002; Steenackers et al., 2012). Los biofilms pueden ser importantes como reservorios de bacterias que pueden colonizar otros ambientes tales como el agua, los alimentos o los tejidos animales.

II.3.- RESISTENCIAS A AGENTES ANTIMICROBIANOS

El aumento de las resistencias microbianas a los antibióticos está alarmando a la comunidad científica y a las autoridades sanitarias. El 27 de febrero de 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publica una lista de bacterias para las que se necesita urgentemente nuevos antibióticos, los criterios para elaborar esta lista son su letalidad, si producen contagios en largas hospitalizaciones, si aparecen resistencias en ambientes no hospitalarios, la transmisión entre animales y personas, si funcionan estrategias de prevención, si hay varias opciones terapéuticas y si hay nuevos antibióticos. La OMS establece tres escalones: prioridad crítica, prioridad elevada y prioridad media. Como prioridad crítica encontramos a *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* por su resistencia a los carbapenémicos y a la familia *Enterobacteriaceae* por su resistencia a los carbapenémicos y productoras de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) capaces de inactivar cefalosporinas de 3ª generación. Los carbapenémicos son antibióticos de elección en algunas enfermedades graves (OMS, 2017a).

El 4 de septiembre de 2017 la OMS participa en la creación de una alianza mundial de investigación y desarrollo de antibióticos dentro de la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Desatendidas en la que están países como Alemania, Luxemburgo, Los Países Bajos, Reino Unido, Sudáfrica, Suiza y la organización benéfica de investigación biomédica Wellcome Trust (OMS, 2017b).

En 2016 la OMS publicó el Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. En este plan se establecen cinco objetivos en la lucha frente a la resistencia a los antimicrobianos: (OMS, 2016).

- 1) Mejorar la concienciación y la comprensión respecto a la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectivas.
- 2) Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación.
- 3) Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones.
- 4) Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.
- 5) Realizar una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

En Europa, según el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), el porcentaje de cepas resistentes a los carbapenémicos aumentó de un 6,2% en 2012 a un 8,1% en 2015. Siguiendo la misma fuente, en España en 2015 la resistencia a los carbapenémicos fue del 2,2% y el porcentaje de cepas resistentes al conjunto formado por cefalosporinas de 3ª generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos era del 11,7% (ECDC, 2016). La Unión Europea estableció un primer plan de acción frente a las resistencias a los antimicrobianos en el periodo 2011-2016, en 2015 se iniciaron propuestas legislativas sobre medicamentos veterinarios y piensos medicamentosos. Se espera que en 2018 estas propuestas acaben con la publicación de Reglamentos vinculantes. En 2017 la Unión Europea ha aprobado un nuevo plan de acción, atendiendo a la resistencia a los antimicrobianos con un nuevo enfoque, tras constatar el desafío tanto económico como social que se plantea, este nuevo enfoque es el de “UNA SALUD”, involucrando muchos sectores diferentes: salud pública, seguridad alimentaria, bioseguridad, medio ambiente, investigación e innovación, cooperación internacional, salud y bienestar de los animales y uso no terapéutico de sustancias antimicrobianas.

A nivel nacional la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios coordina el Plan Nacional Estratégico y de Acción para Reducir el Riesgo de Selección y Diseminación de Resistencias a los Antimicrobianos. Este plan desarrolla seis líneas estratégicas:

- I) Vigilancia del consumo y de la resistencia a los antibióticos.
- II) Controlar las resistencias bacterianas.
- III) Identificar e impulsar medidas alternativas y/o complementarias de prevención o tratamiento.
- IV) Definir prioridades en materia de investigación.
- V) Formación e información a los profesionales sanitarios.
- VI) Comunicación y sensibilización de la población en su conjunto y de grupos de población.

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), participa en la primera línea estratégica (Vigilancia del consumo y de la resistencia a los antibióticos). Para aplicar esta línea se utiliza como base legal la Decisión de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos (DOUE, 2013). Los considerandos de esta norma hacen un recorrido por la preocupación que surge en las instituciones europeas (Comisión, Consejo y el Parlamento) sobre las resistencias microbianas y la necesidad de realizar acciones. Tras la publicación de documentos científicos como: “Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas” que es una Comunicación de la Comisión al Parlamento de 15 de noviembre de 2011 y que origina que el 22 de junio de 2012 el Consejo, mediante la iniciativa “Una perspectiva de Salud Única” pida que se ejecuten las doce acciones propuestas en esa Comunicación y que sea en colaboración con el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). El 11 de noviembre de 2012, el Parlamento Europeo adoptó un informe sobre el desafío microbiano, “La creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos”, mediante este informe la Comisión propone un plan quinquenal coordinado con los Estados Miembros para la detección precoz, la notificación y la respuesta coordinada ante las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos en

humanos, animales terrestres, peces y otros alimentos. La aplicación de este plan quinquenal requiere priorizar la dirección de los esfuerzos, el 14 de junio de 2012 y el 5 de octubre de 2012 la EFSA publicó informes científicos sobre vigilancia armonizada y la presentación de informes de la resistencia a los antibióticos de *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* así como *Enterococcus* spp. transmitidas por alimentos y de *S. aureus* resistente a la meticilina en alimentos y en animales destinados a la producción de alimentos. La forma de realizar esta vigilancia es incluyendo esta actividad dentro del marco de los programas nacionales de control ya existentes. En esta decisión se establece la obligatoriedad de recoger cepas representativas de *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, indicador comensal *E. coli* y *Salmonella* spp. y *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro ampliado, β -lactamasas AmpC o carbapenemasas. Además deja abierta la posibilidad de que se recojan cepas de *Campylobacter coli* e indicadores comensales de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. El muestreo, aislamiento y antibiograma se realizará cada dos años alternando especies animales según el siguiente sistema de rotación: en 2014, 2016, 2018 y 2020 se muestrearán las gallinas ponedoras, los pollos de carne y su carne fresca y los pavos de engorde y en 2015, 2017 y 2019 los cerdos, los bovinos menores de un año, la carne de cerdo y la carne de bovino.

Las enfermedades de los peces son un gran obstáculo para el crecimiento sostenible del sector pesquero. *Aeromonas hydrophila* es uno de los principales patógenos de animales acuáticos, agente causante de úlceras, y septicemia hemorrágica en el pescado, y se ha descrito la resistencia de esta bacteria frente a muchos de los antibióticos disponibles (Mahanty et al., 2013). En diversos tejidos de peces se detectó el patógeno observándose resistencia frente a antibióticos, tales como amoxicilina, ampicilina, lincomicina, novobiocina, oxacilina, penicilina, rifampicina y tetraciclina (Belem-Costa et al., 2006).

Entre los pescados, crustáceos, mariscos, moluscos, y productos derivados las infecciones se produjeron por Calicivirus, toxinas marinas, *Salmonella*, *E. coli* y un 28,6% de origen desconocido. Una preocupación creciente en el sector pesquero es el incremento de cepas resistentes o multirresistentes a los agentes antimicrobianos en la cadena alimentaria (EFSA-ECDC 2013a, ECDC 2012; ECDC, 2013).

Listeria monocytogenes se ha descrito también como patógeno bacteriano de preocupación en los productos del mar. Un estudio encontró *L. monocytogenes* en un 30% de las muestras de pescado ahumado, aunque los recuentos viables estaban por debajo de 100 UFC/g (Uyttendaele et al., 2009). Otro estudio encontró poblaciones de *L. monocytogenes* superiores a 10^2 UFC/g en el 2,6% del pescado fresco, un 5,1% en el pescado ahumado y el 10% en el pescado salado comprado en granjas de peces, mientras que el 20% de pescado ahumado comprado en un mercado de pescado estaban también contaminadas (Basti et al., 2006). La bacteria también se encontró en filetes crudos de bagre (23,5%), la trucha (5,7%), tilapia (10,3%), y el salmón (10,6%) (Pao et al., 2008), o en el 44,5% de los peces de agua dulce crudos ensayados (Yücel y Balci, 2010).

L. monocytogenes también se detecta en algunos mariscos crudos, piezas de atún y pescado, o en huevos de salmón y bacalao, donde puede multiplicarse rápidamente bajo condiciones de abuso de temperatura (Takahashi et al., 2011). Tales productos del mar son algunos de los ingredientes más populares del sushi para los consumidores de todas las edades. Los mariscos mínimamente procesados refrigerados listos para comer también pueden suponer riesgos para la salud de las personas debido a la contaminación por *L. monocytogenes*. La proliferación de *L. monocytogenes* en productos poco elaborados que se consumen sin cocción adicional (como productos del mar ahumados en frío) es también un motivo de preocupación.

Las cepas de *Listeria* encontradas en alimentos marinos podrían transmitir resistencia a antibióticos. En un estudio sobre cepas ambientales de *Listeria* aisladas de estuario, ostras y pescado, Rodas-Suárez et al. (2006) describieron porcentajes de resistencia del 9,7% para dicloxacilina, 13,2% para cefuroxime y cefalotina, 16,7% para tetraciclina, 30,9% para eritromicina, 37,4% para trimetoprim-sulfametoxazol, 57,4% para penicilina, 60,3% para ampicilina, 67,6% para ceftazidima, 73,5% para pefloxacina, y 5,9% para gentamicina. Así mismo, describieron la presencia de cepas multirresistentes. Otro estudio describió que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos marinos, mercado y ambientes de procesado eran altamente resistentes a penicilina, ampicilina, tetraciclina y vancomicina (Fallah et al., 2013). Igualmente, otro estudio sobre cepas aisladas de pescado vendido en puestos al aire libre arrojó niveles significativos de resistencia a tetraciclina (27,9 %), ampicilina (20,9 %), cefalotina,

penicilina G, y estreptomicina (16,3 % en cada caso) en las cepas identificadas como *L. monocytogenes* (Jamali et al., 2015).

Estudios recientes también han descrito otras bacterias como *B. cereus* enterotoxigénica, capaz de crecer en la superficie de salmón a temperaturas abusivas, con tiempos de generación de 169,7; 53,5 y 45,6 min a los 12, 16 y 20 °C (Labbé y Rahmati, 2012). La enterotoxina no hemolítica producida por esta bacteria fue detectada en el salmón después de 20 horas a 20°C y después de 26 horas a 16°C, observándose que los niveles de *B. cereus* eran superiores a 10^8 UFC/g, lo que indica que el salmón fresco puede servir como un excelente sustrato para *B. cereus* enterotoxigénico y que puede llegar a niveles asociados con las enfermedades transmitidas por los alimentos por abuso de temperatura (Labbé y Rahmati, 2012). Aunque *B. cereus* es una bacteria de interés en alimentos, existen pocos datos sobre su resistencia a antibióticos.

II.3.1.- Resistencia a biocidas

La Directiva 98/8/CE referida a biocidas es transpuesta a la reglamentación nacional mediante el Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas, modificado por la ORDEN PRE/1982/2007, de 29 de junio, por la que se modifican los anexos IVA y IVB. Dicha directiva queda derogada a partir del 1 de septiembre de 2013 por el Reglamento (UE) N° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. A este reglamento se le suma el Reglamento (UE) 354/2013 de ejecución del reglamento anterior sobre cambios de biocidas autorizados, también aplicable a partir del 1 de septiembre de 2013.

Según el Reglamento (UE) 528/2012 se definen los biocidas como “toda sustancia o mezcla, en la forma en la que se suministra al usuario, que esté compuesta por, o genere una o más sustancias activas, con la finalidad de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o de ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una mera acción física o mecánica”.

Los alimentos son un medio favorable para el crecimiento de los microorganismos, que provocan su deterioro. Precisamente para proteger y evitar su deterioro se utilizan los biocidas que son compuestos antioxidantes que atacan de forma específica mediante interacciones químicas, o sobre moléculas esenciales para el metabolismo bacteriano y de otros seres vivos (Russell, 2002). La acción de los biocidas dependerá del tipo de microorganismos sobre el que queramos actuar, debido a sus diferentes características fisiológicas, metabólicas. El mecanismo de acción de los biocidas se fundamenta en que actúan sobre las moléculas de la membrana de la célula viva, especialmente sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos (fosfolípidos), ácidos nucleicos y sobre otras pequeñas moléculas, como algunas vitaminas, hormonas y ciertos elementos minerales esenciales presentes en las células (Gilbert y McBain, 2003; Cerf et al., 2010). Al actuar sobre diferentes dianas, es muy difícil determinar cuáles son los efectos concretos que provocan o contribuyen a la muerte del microorganismo. Principalmente interaccionan con la superficie celular, pero una vez dentro del microorganismo, puede dañar uno o más componentes celulares, mediante tres mecanismos de acción: envenenamiento de los sistemas enzimáticos, alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular, o coagulación y precipitación de proteínas celulares (Webber et al., 2008).

II.3.1.1.- Tipos de biocidas

Los tipos de biocidas con sus descripciones y aplicaciones se detallan en el Anexo V, en el artículo 2, apartado 1 del reglamento, quedando clasificados en el grupo principal 1 los de uso alimentario:

GRUPO PRINCIPAL 1. Desinfectantes.

Estos tipos de biocidas excluyen los biocidas de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos y en polvo y productos similares.

Tipo de producto 1: Higiene humana.

Tipo de producto 2: Desinfectantes y alguicidas no destinados a la aplicación directa a personas o animales.

Tipo de producto 3: Higiene veterinaria.

Tipo de producto 4: Alimentos y piensos.

Productos empleados en la desinfección de equipos, recipientes, utensilios para consumo, superficies o tuberías relacionados con la producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos o piensos (incluida el agua potable) para personas y animales. Productos empleados para impregnar materiales que puedan estar en contacto con alimentos.

Tipo de producto 5: Agua potable.

Productos empleados para la desinfección del agua potable, tanto para personas como para animales.

GRUPO PRINCIPAL 2. Conservantes. (No relacionados con alimentos)

Desde tipo de producto 6 a 13.

GRUPO PRINCIPAL 3. Plaguicidas.

Desde tipo de producto 14 a 20.

GRUPO PRINCIPAL 4. Otros biocidas.

Tipo de producto 21 y 22.

Se puede considerar Biocida:

- ☐ Toda sustancia o mezcla, en la forma en la que se suministra al usuario, que esté compuesta por, o genere una o más sustancias activas, con la finalidad de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o de ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una mera acción física o mecánica.
- ☐ Toda sustancia o mezcla generada a partir de sustancias o mezclas distinta de las contempladas en el primer guión, destinada a ser utilizada con la intención de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una mera acción física o mecánica.

II.3.1.2.-Propiedades deseables de un biocida

Al desinfectar las superficies que contactan con los alimentos, en raras ocasiones se necesita alcanzar la esterilidad absoluta. El fin corrientemente perseguido es disminuir el número de microorganismos, de forma que los que sobrevivan no influyan en la calidad microbiológica de los alimentos que contactan con dichas superficies (Tezel y Pavlostathis, 2015).

La eficacia de los desinfectantes químicos se resiente por la presencia de suciedad, cuanto más limpia está la superficie más eficaz será el desinfectante utilizado y la desinfección debe producirse inmediatamente después de la limpieza. En condiciones ideales, los desinfectantes en las superficies que contactan con los alimentos, deben cumplir:

1. Destruir rápidamente los microorganismos, siendo igual de eficaces con las bacterias Gram-positivas que con las Gram-negativas. Deben destruir la mayoría de las esporas fúngicas, siendo también conveniente la destrucción de las esporas bacterianas.
2. Ser suficientemente estables en presencia de residuos orgánicos y si fuera necesario, en presencia de aguas duras.
3. No ser corrosivos ni dar color a ninguna superficie.
4. Ser inodoros y no desprender olores desagradables.
5. No ser tóxicos, ni irritantes a los ojos o a la piel.
6. De fácil solución en agua y eliminación por enjuagado.
7. Estables durante mucho tiempo en forma concentrada y durante un tiempo más breve en forma diluida.
8. Económicamente competitivos y al emplearlos presentar una buena relación coste/efectividad.

II.3.1.3.- Clasificación según su función química

1. Cloro y derivados clorados

a. Identificación:

i. Hipoclorito de sodio

- ☐ Nombre común: lejía.
- ☐ Nombre químico: hipoclorito de sodio.
- ☐ Fórmula desarrollada: Na-O-Cl.
- ☐ Titulación: la lejía se corresponde con una solución que contiene 12,5% de cloro activo.

b. Físico-química:

El hipoclorito de sodio es relativamente inestable a la temperatura y a la luz. Los derivados de cloro, en forma de polvo, son más estables pero sensibles a la humedad. La forma activa es el ácido hipocloroso, no es estable y su actividad depende de dos factores: pH y temperatura. A pH alcalino no es activo, a pH ácido se produce cloro gaseoso, muy tóxico. pH óptimo entre 4 y 6. La temperatura alta junto con materia orgánica y luz descomponen el ácido hipocloroso y lo inactivan. Fuerte poder oxidante y corrosivo.

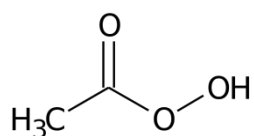
c. Propiedades microbiológicas-mecanismo de acción:

Su forma activa es el ácido hipocloroso, produce una destrucción de las proteínas estructurales y un bloqueo de la actividad enzimática. Los generadores de ácido hipocloroso son muy buenos bactericidas y virucidas. La actividad fungicida es poco marcada y la actividad esporicida casi nula.

d. Usos:

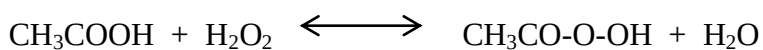
Los derivados clorados son principalmente utilizados en tratamiento de superficies después de la limpieza, las superficies deben ser resistentes a la corrosión por oxidación.

2. Ácido peracético



a. Identificación: **Ácido P-3 oxonia.**

Las soluciones de ácido peracético están constituidas, fundamentalmente de cuatro compuestos que aseguran el equilibrio inestable siguiente:



Una formulación tipo de ácido peracético puede ser:

- ☐ Ácido peracético: 5% p/v.
- ☐ Peróxido de hidrógeno: 25 a 28% p/v.
- ☐ Ácido acético: 5 a 6% p/v.
- ☐ Agua: c.s.: por 100 p/p.
- ☐ Estabilizantes: < 1% p/p.

b. Físico-química:

Las soluciones de ácido peracético son incoloras, de olor picante y lacrimógenas. Las soluciones comerciales normalmente tienen entre un 2 y un 5% de ácido peracético. El pH es muy ácido, cercano a 1. La estabilidad se

mantiene conservándolo a baja temperatura, en ausencia de luz y ausencia de metales pesados durante la fabricación-formulación.

El ácido peracético diluido en agua destilada no provoca ni corrosión localizada ni generalizada. Pero cuando el agua de dilución contiene trazas de cloruro (agua de red o de pozo) los aceros inoxidable se muestran muy sensibles.

c. Propiedades microbiológicas-mecanismo de acción:

Su mecanismo de acción consiste en romper los enlaces intramoleculares de los enzimas y compuestos de la membrana por ruptura oxidativa. Afecta a las reacciones intracelulares y de la membrana debido al carácter oxidante. La catalasa que inactiva al peróxido de hidrógeno no afecta al ácido peracético y además se ve inactivada por este.

El ácido peracético presenta actividad bactericida y esporicida, fungicida y virucida.

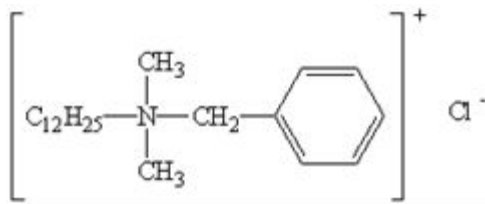
d. Usos:

Las soluciones de ácido peracético son principalmente utilizadas para la desinfección de los circuitos de tuberías después de la limpieza de las industrias lácteas y de bebidas. También es interesante para la desinfección de superficies por pulverización.

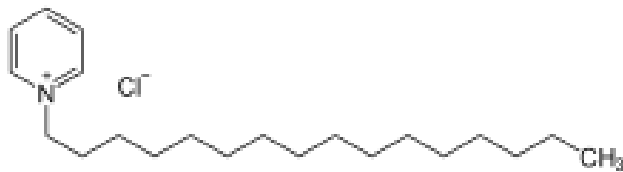
La toxicidad es la que corresponde a los compuestos oxidantes y a los ácidos. Es considerable el riesgo de daño en la mucosa ocular y cierta toxicidad por vía respiratoria.

3. Amonios cuaternarios

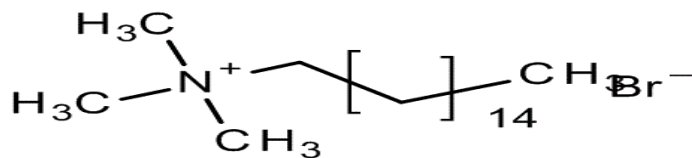
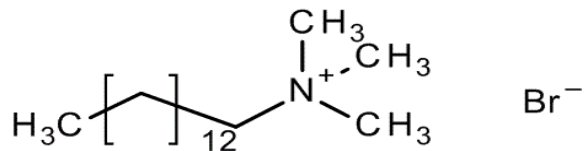
a. Identificación:



- **Cloruro de benzalconio (cloruro de dimetil-bencil-amonio).**



- **Hexadecilpiridinio (cloruro de cetil-piridinio o cloruro de 1-hexadecilpiridinio).**



- **Cetrimida (mezcla de bromuro de tetradeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio).**

Las cadenas alquilo están constituidas por alcoholes grasos de tipo C₈ a C₁₈.

b. Físico-química:

Los amonios cuaternarios, presentes en forma de polvo o líquido, tienen múltiples propiedades como poder mojante, solubilizante, emulsionante, suavizante y/o antimicrobiano. Son solubles en agua y en etanol. Bajan notablemente la tensión superficial de los líquidos a los que se incorporan. El carácter espumante es variable. La estabilidad a la temperatura y pH es muy notable (Russell, 2002).

El carácter catiónico le impide formularse con mezclas tenso-activos aniónicos y jabones. El carácter reductor es antagónico con los derivados oxidantes.

Los amonios cuaternarios son reductores, por tanto no oxidantes. Los aceros inoxidable, las principales aleaciones y los materiales plásticos aceptan sin alteración notable las preparaciones de amonio cuaternario. Sin embargo, debido al carácter ácido del catión del aluminio, éste se puede degradar por el amonio cuaternario.

c. Propiedades microbiológicas-mecanismo de acción:

Los amonios cuaternarios se adsorben a nivel de los grupos cargados negativamente de las estructuras celulares de la superficie, la desorganización de la membrana (delamelación) da lugar a una modificación de la permeabilidad y a una desnaturalización de las proteínas de estructura y de los enzimas (Gilbert y Moore, 2005; Alonso-Hernando et al., 2010).

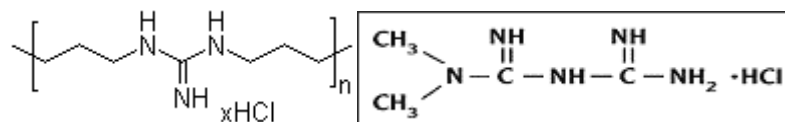
La actividad microbiana depende del compuesto, en general son muy buenos fungicidas y alguicidas, buenos bactericidas y no muy buenos virucidas (Gerba, 2015).

d. Usos:

Se utilizan en desinfección estática de material, en desinfección de equipamiento y de las superficies por pulverización y en desinfección de los circuitos de tuberías.

4. Clorhidrato de polihexametilen biguanida

a. Identificación:



- ☐ **PHMG: Clorhidrato de polihexametileno guanidina.** (La fórmula de la derecha es del clorhidrato de biguanida sin polimerizar).

b. Físico-química:

El PHMG se presenta habitualmente en forma de solución acuosa, incolora o amarillenta, ligeramente opalescente que contiene hasta un 20% de materias activas. Es termoestable y no volátil, de carácter catiónico y soluble en todas proporciones en agua. Las bases fuertes como el hidróxido de sodio, el metasilicato de sodio y los fosfatos precipitan el PHMG. Es incompatible con los tenso-activos aniónicos y las proteínas.

Los aceros inoxidables, las aleaciones de aluminio, el acero estañado, el cobre estañado, el latón y el níquel no son afectados por la corrosión. El cobre es sensible a las soluciones concentradas.

c. Propiedades microbiológicas-mecanismo de acción:

El PHMG es absorbido por la pared microbiana provocando lesiones irreversibles por fenómenos de coagulación con inhibición enzimática y destrucción de membrana. Hay reactividad específica con los fosfolípidos de la pared, inducen un aumento de la permeabilidad de la membrana y la formación de agregados (Gilbert y Moore, 2005).

La actividad bactericida es buena, las actividades fungicidas y virucidas son débiles.

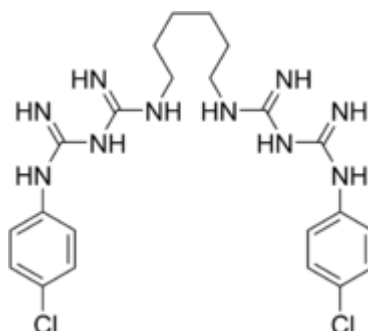
El PHMG es poco agresivo para la piel y las mucosas en las dosis de empleo y generalmente bien tolerado por el hombre.

d. Usos:

Se utilizan en desinfección de los circuitos de tuberías de forma dinámica ya que no es espumante. El espectro microbiano estrecho necesita otra asociación con principios activos, pero con cuidado debido a la relativa incompatibilidad de esta molécula con las demás familias de antimicrobianos.

5. Clorhexidina

a. Identificación:



□ **Clorhexidina: di-(N-paraclorofenildiguanido)1-6 hexano.**

b. Físico-química:

La clorhexidina base se presenta en forma cristalina incolora. El digluconato de clorhexidina es la sal más utilizada debido a su solubilidad en agua. La solubilidad, muy dependiente de los iones presentes en el agua de dilución, estará fuertemente influenciada por los ácidos débiles o fuertes (Russell, 2002).

El digluconato de clorhexidina tiene un carácter catiónico. Presenta numerosas incompatibilidades químicas (compuestos aniónicos, compuestos alcalinos). El pH de su actividad se sitúa entre 5 y 8, fuera de estos límites se produce una caída brutal de su eficacia.

Frente a la corrosión la clorhexidina y sus sales tienen el mismo comportamiento frente que el PHMG: Los aceros inoxidable, las aleaciones de aluminio, el acero estañado, el cobre estañado, el latón y el níquel no son afectados por la corrosión. El cobre es sensible a las soluciones concentradas.

c. Propiedades microbiológicas-mecanismo de acción:

La clorhexidina reacciona con los radicales cargados negativamente de la pared bacteriana y es rápidamente absorbida, se produce una precipitación de las proteínas y de los ácidos nucleicos (McDonnell y Russell, 1999).

La actividad bactericida es buena, las actividades fungicidas y virucidas son débiles.

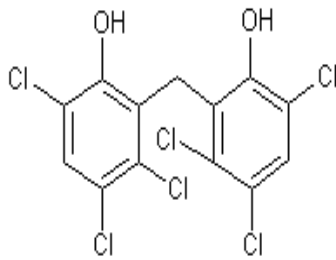
La clorhexidina y sus sales son bien toleradas por la piel y las mucosas por lo que son usadas como antisépticos. La absorción a través de la piel sana es despreciable. No se ha descrito ningún efecto mutágeno teratógeno.

d. Usos:

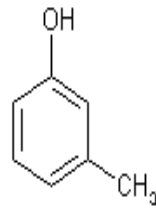
Se utilizan para jabones antisépticos, soluciones hidroalcohólicas sin necesidad de enjuagar y como desinfectante de superficie por pulverización.

6. Fenoles

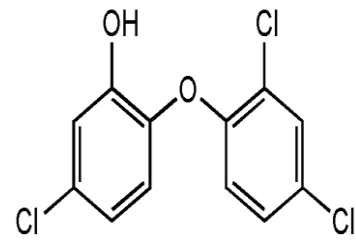
a. Identificación:



Hexaclorofeno



Cresol



Triclosán

- ☐ **Triclosán: 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol.**
- ☐ **Hexaclorofeno: 2,2-metilen-bis(3,4,6-triclorofenol)/bis(3,5,6-tricloro-2-hidroxifenil)metano.**

b. Físico-química:

Los fenoles, poco solubles en el agua, dan fácilmente sales sódicas hidrosolubles pero son menos eficaces. Presentan incompatibilidades químicas con los derivados catiónicos y antagonismo con algunos no iónicos. Presentan inestabilidad a la luz, necesitan recipientes opacos. Los derivados alcalinos son utilizables solo en el rango de pH de 11 a 14.

No son considerados corrosivos frente a los materiales ferrosos. La absorción sobre los materiales plásticos puede alterar, a medio plazo, sus propiedades mecánicas.

c. Propiedades microbiológicas-mecanismo de acción:

El poder bactericida es debido a una lisis celular por desnaturalización de la membrana citoplasmática y de los enzimas o de una combinación *in situ* con los constituyentes citoplasmáticos pero sin fuga celular. Los fenoles presentan actividad bactericida frente a Gram-positivas y Gram-negativas. La actividad fungicida es pequeña y no son considerados como virucidas y esporicidas (Goddard y McCue, 2001).

La actividad bactericida es buena, mientras que las actividades fungicidas y virucidas son débiles. Ciertas combinaciones de fenoles aumentan el espectro bactericida y fungicida.

Algunos compuestos como el pentaclorofenato (PCP) pueden presentar toxicidad aguda. Los fenoles tienen carácter lipófilo; absorbidos por la piel y mucosas pueden producir alergias y fotosensibilizaciones.

d. Usos:

Se utilizan en el sector hospitalario y veterinario como desinfectantes de las superficies.

En la tabla 4 se observan las ventajas e inconvenientes de los biocidas mencionados.

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los desinfectantes (Leveau, 2002).

	Ventajas	Inconvenientes
Cloro y derivados clorados	☐ Bactericida, virucida. ☐ Poco espumante. ☐ Barato. ☐ Buen enjuagado.	☐ Corrosión. ☐ Sensibles a materia orgánica. ☐ Inestable a alta T ^a . ☐ Toxicidad: cloro gas (ácidos).
Ácido P-3 oxonia	☐ Bactericida, fungicida, virucida, esporicida. ☐ Poco espumante ☐ Barato. ☐ Buen enjuagado. ☐ Activo a baja T ^a . ☐ Acción rápida.	☐ Corrosión. ☐ Sensibles a materia orgánica. ☐ Inestable a alta T ^a . ☐ Vapores irritantes. ☐ Incompatibilidades químicas.
Amonios cuaternarios (CLB, HDP, Cetrimida)	☐ Bactericida, fungicida. ☐ Coste moderado. ☐ No corrosivos. ☐ Estable a pH y T ^a . ☐ Poco tóxico.	☐ Espumante. ☐ No virucida. ☐ Incompatibilidades con derivados aniónicos.

	Ventajas	Inconvenientes
PHMG	☐ Bactericida. ☐ No espumante. ☐ No corrosivo. ☐ Poco tóxico. ☐ Ausencia de olor.	☐ No virucida. ☐ Coste elevado. ☐ Incompatibilidades químicas.
Clorhexidina	☐ Bactericida. ☐ No corrosivo. ☐ Poco tóxico. ☐ Ausencia de olor.	☐ No virucida. ☐ Coste elevado. ☐ Incompatibilidades químicas. ☐ Inestabilidad ligadas a T ^a y pH.
Fenoles (Triclosán, HCF)	☐ Bactericida. ☐ No corrosivo. ☐ Resistencia a materia orgánica.	☐ Espumante. ☐ Coste elevado. ☐ Inestabilidad ligada al pH.

II.3.1.4.- Mecanismos de resistencia a biocidas

Esta resistencia puede ser una propiedad natural de un microorganismo (intrínseca), adquirida mediante mutación o por plásmidos (autorreplicación, ADN extracromosómico) o transposones (cromosómico o integrado en plásmidos, casetes de ADN transmisibles). La resistencia natural puede deberse a diversos factores, como carencia de la diana, presencia de una diana insensible al antibiótico, o impermeabilidad de la célula al antibiótico (Frost et al., 2005). Estas resistencias bacterianas se han identificados en bacterias Gram-negativas, esporas, micobacterias y en bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus*.

En el caso de las bacterias Gram-negativas, es conocida su mayor resistencia a los desinfectantes que las Gram-positivas. En diversos estudios de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que presentan tanto las Gram-positivas como las Gram-negativas, se detectaron diferencias importantes entre *S. aureus* y *E. coli* a los derivados de amonio cuaternario, hexaclorofeno, diamidinas y triclosán, aunque se detectó poca diferencia en la susceptibilidad a la clorhexidina. *P. aeruginosa* es más resistente a la mayoría de estos agentes, incluyendo la clorhexidina (Gilbert, 2003).

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes desinfectantes. Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana. Los derivados de amonio cuaternario son capaces de dañar la membrana y provocar su autocaptación (Russell y Gould, 1988; Ayres et al., 1993; Gilbert, 1988; Hammond et al., 1984; Nikaido, 1994, Hancock et al., 1984). La presencia en la membrana externa de un lipopolisacárido menos ácido puede ser un factor favorable a la resistencia intrínseca (Cox y Wilkinson 1991; Hugo y Russell, 1999).

La resistencia adquirida se produce por mutación o por la adquisición de material genético en forma de plásmidos o transposones (Frost et al., 2005). Aunque algunos autores no relacionan el papel de los plásmidos en la resistencia codificada a los antisépticos y desinfectantes (Chopra, 1982, 1987), otros autores si evidencian la relación entre la presencia de plásmidos en bacterias con el aumento de la tolerancia a clorhexidina, triclosán, así como a diamidinas (Russel, 1997).

Una de la preocupaciones del uso de biocidas, es que pueden provocar co-selección de cepas resistentes a antibióticos de uso clínico, como se ha comprobado en el caso del triclosan y otros (Chuanchuen et al., 2001; Braoudaki y Hilton, 2004; Ortega Morente et al., 2012).

Los biocidas son ampliamente utilizados en la desinfección de equipos e instalaciones (Directiva 98/8 / CE). En bacterias Gram-negativas se han descrito numerosos genes para resistencia a biocidas derivados del amonio cuaternario (QAC), como *qacE*, *qacEΔI*, *qacF*, *qacG* y *qacH*. De todos ellos, *qacEΔI* es el que está más extendido, encontrándose en diversos grupos de bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *P. stuartii*, *Proteus vulgaris*) (Kücken et al., 2000). Se ha descrito que *qacEΔI* (y en menor frecuencia *qacH* y *qacF*) está asociado a integrones de la clase I, junto con genes de resistencia a antibióticos (Mulvey et al., 2006; De Toro et al., 2011). Un estudio sobre poblaciones microbianas de ambientes contaminados

con QACs relaciona la mayor incidencia de resistencia a QACs con una mayor incidencia de integrones de la clase I (Gaze et al., 2005), lo que sugiere que la exposición a QACs podría co-seleccionar resistencia a antibióticos asociados a este tipo de integrones.

Otro mecanismo de resistencia se debe a los sistemas de exporte formados por tres componentes (como AcrAB-TolC o OqxAB), que también están ampliamente diseminados en las bacterias Gram-negativas (Poole et al., 2005, 2007; Hansen et al., 2007). Estos sistemas de exporte pueden disminuir la sensibilidad de las bacterias a una amplia variedad de biocidas, como derivados del amonio cuaternario, clorhexidina, triclosan, o cetrimida. La mayoría de los sistemas de exporte son bastante inespecíficos, y confieren resistencias a una variedad de antimicrobianos incluyendo biocidas (como se ha mencionado anteriormente) y antibióticos, como fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas, cetolidos, glicilglicinas, y oxazolidinonas (Poole, 2007).

El uso de biocidas en la piscicultura, en virtud de los requisitos previos de la Directiva 98/8/ CE, permite una gama de desinfectantes para la descontaminación en la cría de peces, o para estanques y equipos como son yodóforos, sales metálicas, compuestos halo orgánicos, aldehídos, peróxido de hidrógeno, compuestos de amonio cuaternario y colorantes antimicrobianos. Diferentes tipos de presión selectiva (como antibióticos, biocidas o metales pesados) podrían desempeñar un papel en la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en la cadena alimentaria.

Hay que tener en cuenta también la posible combinación de otros agentes antimicrobianos tales como lisozima-EDTA y conservantes químicos, o lactato de sodio y fosfato trisódico, merecen atención debido a su amplio uso y múltiples aplicaciones en la industria alimentaria para la descontaminación y conservación de alimentos (Lucera et al, 2012; Bjornsdottir-Butler et al., 2015; Wang et al., 2015). Se desconoce por el momento si este tipo de agentes podrían co-seleccionar resistencias a antibióticos.

Por otro lado actualmente se buscan alimentos nuevos, con una vida media estable, con larga y alta protección frente a los microorganismos, es decir, alimentos naturales caracterizados por estar libres o poseer bajos niveles de aditivos químicos, lo

que ha llevado a la búsqueda de componentes antimicrobianos naturales para reemplazar a los compuestos químicos convencionales (Benkeblia, 2004; Leite de Souza et al., 2005, 2006).

Existen más de 1300 plantas conocidas como fuentes potenciales de compuestos antimicrobianos, el ajo, la cebolla, la menta, el anís, la albahaca, el cilantro, la canela, y el orégano... han sido usados por su potencial antimicrobiano, (Ravi et al., 2008; Reichling et al., 2009) Los extractos de estas plantas han sido considerados como antibacterianos naturales de alimentos y pueden ser usados como métodos adicionales para el control del crecimiento y supervivencia de microorganismos alterantes y patógenos (Ertas et al., 2005; Normanno et al., 2007, Pinto et al., 2009). Otros aceites esenciales de plantas o sus compuestos antimicrobianos tales como carvacrol o timol se utilizan también para la desinfección y conservación de alimentos (Lucera et al., 2012; Patel, 2015; Wang et al., 2015).

Un estudio mostró que la exposición al aceite de pino indujo una disminución de la susceptibilidad a una gama de compuestos antimicrobianos incluyendo antibióticos y biocidas, (Moken et al., 1997). Sin embargo, poco se sabe sobre el desarrollo de la resistencia / tolerancia a estos compuestos, y la co-resistencia a los antibióticos.

II.3.2.- Resistencia a antibióticos

Según el Reglamento CE N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre aditivos en la alimentación animal, los antimicrobianos son sustancias producidas sintética o naturalmente que se utilizan para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos, entre ellos bacterias, virus y hongos, y parásitos, en particular protozoos. Y los antibióticos son antimicrobianos producidos por un microorganismo o derivados de éste que destruyen o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. (DOUE, 2003).

II.3.2.1.- Historia de los antibióticos

La historia de los antibióticos es un camino de grandes esperanzas respecto a la curación de enfermedades muy graves, camino que se ha estrechado después de varias décadas de un uso poco apropiado para fines más comerciales que de salud. Grandes científicos han puesto su esfuerzo en conseguir antimicrobianos más efectivos frente a más enfermedades y desde el principio han ido advirtiendo de su uso responsable para que los microorganismos no consigan ser resistentes.

Hacia 1859, Louis Pasteur propuso la “teoría microbiana de la enfermedad”, en 1864 la Academia Francesa de Ciencias aceptó finalmente y avaló la teoría de Pasteur, dicha teoría fue necesaria para el posterior desarrollo de la terapéutica antibiótica. Joseph Lister, médico y cirujano inglés influido por los descubrimientos de Pasteur, en 1867 demostró que los métodos antisépticos eran fundamentales para evitar la infección de las heridas. Robert Koch, médico rural alemán, considerado junto con Pasteur el padre de la bacteriología, en 1881 consiguió utilizar un medio sólido en placas para el cultivo de bacterias, aisló *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae* y el bacilo tuberculoso. Hans Christian Joachim Gram, médico danés, en 1884 presentó en Berlín el método Gram para la clasificación de las bacterias. Jean Paul Vuillemin, médico francés de la Universidad de Nancy, dedicado a la micología, describió en 1889 el fenómeno por el cual determinados organismos producen sustancias que pueden matar a otros microorganismos con los que conviven y lo denominó “influencias antibióticas”.

Aunque fue Selman Abraham Waksman microbiólogo estadounidense de origen soviético quien en 1941 propuso el término de antibiótico para referirse al grupo cada vez mayor de sustancias antibacterianas. En 1889 Rudolf Emmerich y Oscar Loew, dos científicos alemanes realizaron los primeros experimentos con la piodianasa, sustancia aislada de *Pseudomonas aeruginosa*, descubrieron que podía destruir bacterias patógenas como *Bacillus anthracis*, *S. aureus* y *Salmonella typhi*, sin embargo era demasiado tóxica como para utilizarla en humanos. Paul Ehrlich médico alemán que dedicó tiempo al estudio de los colorantes en la identificación de células, a partir de 1905 consiguió un producto derivado del arsénico, el arsenobenzol, útil frente a la sífilis aunque su toxicidad era elevada. En las primeras décadas del siglo XX se probaron otras

sustancias que también eran tóxicas y decayó un poco la ilusión de encontrar un producto que fuese efectivo y no tóxico.

A pesar de todo, la búsqueda continuó, Alexander Fleming, médico escocés que trabajaba en un hospital de Londres, en 1928 observó que una placa con crecimiento de colonias bacterianas había sido contaminada con un hongo y había producido lisis, pudo demostrar que la sustancia la producía el hongo *Penicillium* y ésta difundía a través del agar, a esta sustancia la llamó “penicilina”. El uso de la penicilina no fue posible hasta 1942, bien por falta de desarrollo tecnológico o bien porque los fracasos anteriores no daban confianza en su uso como fármaco sistémico. En 1930, Gerhard Domagk, médico alemán que trabajaba para el laboratorio I.G. Farbenindustrie en el desarrollo de colorantes, utilizó uno de ellos “el prontosil” para tratar animales enfermos. Posteriormente se demostró que el efecto antibiótico era debido al residuo de la sulfonamida contenido en el colorante.

Las sulfamidas se convirtieron en las primeras sustancias administradas internamente eficaces y sin toxicidad. Esto estimuló la búsqueda de nuevos antibacterianos. En torno a 1940, Selman Waksman y su discípulo René Dubós estudiando las propiedades antibacterianas de los microorganismos del suelo llegaron a encontrar antibióticos pertenecientes a la familia de los aminoglucósidos como la gramicidina y la estreptomicina, antibióticos que complementaban el uso en infecciones para las que la penicilina no era efectiva, aunque algo más tóxicos. A finales de la década de 1940 varios científicos consiguieron aislar otras sustancias con efecto antibiótico como Paul Burkholder que aisló el cloranfenicol, antibiótico de amplio espectro pero de alta toxicidad y Benjamin Duggar que aisló la clortetraciclina, también de amplio espectro y menos tóxica que el cloranfenicol.

En 1964, el laboratorio de Howard Florey en Oxford, consiguió aislar antibióticos de familia de las cefalosporinas del hongo *Cephalosporium acremonium* después de muchos años de trabajo. El descubrimiento de antibióticos naturales se acompañó de otros antibióticos de síntesis, bien partiendo de las moléculas de los naturales y modificándolas, bien de nuevo desarrollo como la trimetropima y las fluoroquinolonas. En las últimas décadas ha descendido la aparición de nuevas familias de antibióticos, esto unido a la aparición de resistencias bacterianas por el uso masivo, a

veces inapropiado como en infecciones víricas y en piensos como promotores del crecimiento de animales de granja hace que cada vez sea más difícil encontrar antibióticos efectivos para enfermedades graves (Belloso, 2009).

Pasteur, en sus trabajos sobre la penicilina, ya describió la facilidad con que las bacterias podían adaptarse a los antibióticos. Actualmente la resistencia a un antibiótico no es ya lo preocupante, lo preocupante es la resistencia a múltiples antibióticos, también conocida como multiresistencia. Se ha adoptado una clasificación en tres niveles teniendo en cuenta la resistencia bacteriana: MDR (Multidrug-Resistant) son resistentes al menos a un fármaco de tres o más grupos distintos, XDR (eXtensively Drug-Resistant) solo son sensibles a antimicrobianos de uno o dos grupos y PDR (Pandrug-Resistant) son resistentes a todos los fármacos recomendados (Rotger y Martínez, 2016). Existe preocupación en el sector pesquero por el aumento de cepas bacterianas procedentes de la cadena alimentaria resistentes a múltiples fármacos (AESAs, 2010; CEPD, 2012, 2013; EFSA-ECDC, 2013; Watts et al., 2017).

II.3.2.2.- Mecanismos de resistencias a antibióticos

Como la mayoría de los seres vivos, las bacterias poseen mecanismos biológicos, que les permiten adaptarse a las diferentes presiones ambientales. El aumento del uso de antibióticos, es el factor más importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia bacterianas (Ang et al., 2004; Blair et al., 2015). El uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares) desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permitan evadirse de estos compuestos.

Estas resistencias pueden deberse a mutaciones cromosómicas o intercambio de material genético mediante la transferencia de genes de resistencia a través de varios mecanismos como pueden ser:

- *Transducción*: o transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano.
- *Conjugación*: Transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de una hebra sexual.

- *Transformación*: Transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (Levy, 1998).

- *Transposición*: Movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular (Levy, 2004).

Existen varios mecanismos de resistencia adquirida que las bacterias pueden utilizar como defensa a los antibióticos:

-Modificación enzimática o destrucción del antibiótico.

Surge de estímulos naturales o mutaciones en los genes cromosómicos o de la adquisición de elementos genéticos extracromosómicos (plásmidos o transposones) que portan los genes de transferencia (Iruka et al., 2005). Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran generalmente en elementos móviles como transposones y plásmidos (Samaja-Kfoury y Araj, 2003). Es por ejemplo el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias frente a antibióticos betalactámicos.

- Impermeabilidad al antibiótico.

En las bacterias Gram-negativas, existe una estructura de membrana consistente en lipopolisacárido y lipoproteína anclados al peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas (OMP). Estas porinas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico (Kapil, 2005).

-Alteración o generación de variantes del sitio diana.

Uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos que se usan en clínica, pues evitan el efecto bactericida/bacteriostático que estimula la resistencia. Es por ejemplo, el mecanismo más común de resistencia a macrólidos (Leclercq y Courvalin, 1991), fluoroquinolonas (Hooper, 2000) o a meticilina (Samaja-Kfoury y Araj, 2003).

-Presencia de bombas de exporte que expulsan el antibiótico.

El mecanismo de exporte para múltiples agentes antimicrobianos contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra tales agentes. El análisis del genoma de

bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas. Este modo de resistencia puede llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos. El exporte está mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos (Moneira et al., 2004). Los sistemas de exporte particularmente de bacterias Gram-negativas se asocian con resistencia a múltiples antimicrobianos de importancia clínica como las fluoroquinolonas (Poole, 2000).

-Sobre-expresión del sitio diana.

Sólo se ha descrito en aislados clínicos de micobacterias. La duplicación génica o las mutaciones de los promotores implicados en la transcripción de estos genes, son probablemente el mecanismo responsable. La hiper-producción de betalactamasas (gen *tem*) induce resistencia al clavulanato y se podría considerar como una sobreexpresión de la diana del antibiótico (Martínez et al., 1989).

Algunos determinantes de resistencia a antimicrobianos, como beta-lactámicos, quinolonas y fluoroquinolonas, pueden ir asociados a plásmidos. Los plásmidos de resistencia a fluoroquinolonas están ampliamente diseminados en Enterobacterias, y se asocian con frecuencia a la resistencia a beta-lactámicos en cepas con fenotipos multirresistentes (Crémet et al., 2011). Algunos genes, como la variante *aac(6')-Ib-cr*, confieren resistencia de forma simultánea a aminoglucósidos y a fluoroquinolonas (Kim et al., 2011). Otros, como *oqxAB* descrito en *E. coli*, confieren resistencia a diversos antibióticos así como a biocidas (Hansen et al., 2007; Wong y Chen, 2013). La localización en elementos móviles de genes que disminuyen la sensibilidad a fluoroquinolonas mediante protección de la diana (*qnr*), modificación del antimicrobiano (*aac(6')-Ib-cr*) o mediante bombas de exporte (*qepA*, *oqxAB*) es un fenómeno creciente en Enterobacterias (Herrera-León et al., 2011; Hopkins et al., 2008; Veldman et al., 2011; Pérez-Moreno et al., 2013) y a menudo ligado a co-resistencia a cefalosporinas y a la presencia de integrones de la clase I (Strahilevitz et al., 2009).

Se han detectado bacterias resistentes a múltiples fármacos que llevan genes de β -lactamasa de espectro extendido (ESBL) en seres humanos sanos, así como en diversas especies animales, alimentos e incluso en muestras ambientales y se han convertido en una amenaza para los entornos hospitalarios. La bacterias de la familia

Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasa son particularmente preocupantes porque tienden a propagarse, dificultando el tratamiento de la infección (Iovleva y Doi, 2017).

El uso inadecuado de los antimicrobianos en acuicultura ha contribuido al desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos y ha creado graves problemas a los ecosistemas acuáticos, principalmente en los países en desarrollo (Woolhouse y Farrar, 2014). Por ejemplo, se han detectado altas resistencias a agentes antimicrobianos como ampicilina, rifampicina y estreptomicina en cepas de *Vibro parahaemolyticus* procedentes de productos acuáticos en países asiáticos y europeos, como el sur de China (Xie et al., 2015), Corea (Kang et al., 2015), Polonia (Lopatek et al., 2015) e Italia (Ottaviani et al., 2013).

II.3.3.- Resistencia a metales pesados

Los metales se encuentran en los procesos de transformación natural de las rocas durante la formación de los suelos, pero su concentración final no supera las condiciones de toxicidad y se encuentran normalmente bajo formas que poco asimilables por los organismos. Sin embargo, la actividad del hombre ha incrementado su contenido en el medio ambiente de forma accidental o deliberada, por medio de residuos de industrias agrícolas o industriales.

La resistencia a metales pesados es el resultado de la actuación de múltiples sistemas con especificidad de sustrato diferentes, pero que entre ellos comparten las mismas funciones. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales potencialmente dañinos, así como frente a las especies que estos producen al interactuar con los componentes celulares (Brown et al., 2006). Otros están muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles la capacidad de resistencia a metales pesados (Nies, 2003; Monchy et al., 2007).

Las bacterias son capaces de desarrollar diferentes sistemas para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005). Entre ellos, se encuentran principalmente los que involucran: i) componentes celulares que capturan a los iones,

neutralizando su toxicidad, ii) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y iii) transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular (Cervantes et al., 2006; Bui et al., 1999).

La contaminación del mar por metales pesados y la contaminación de los peces se han convertido en un motivo de gran preocupación, no sólo por el riesgo para la salud de los peces, sino también por el peligro para la salud humana por el consumo de peces marinos (Zelikoff, 1993; Gu et al., 2016). Los metales pesados como el Cu y el Zn tienen un papel importante en los sistemas biológicos, pero pueden ser tóxicos a concentraciones superiores a las óptimas, mientras que el Cd, el Pb, el Cr y el Ni son tóxicos incluso a concentraciones traza (Uluozlu et al., 2013; Gu et al., 2015a; Liu et al., 2015).

Los metales como el cobre (Cu) y cinc (Zn), son micronutrientes esenciales en los seres vivos, pero estos pueden llegar a ser tóxicos si se encuentran por encima de cierta concentración. Los contaminantes metálicos de origen industrial pueden alcanzar los ambientes acuáticos a través de diferentes vías. Algunos organismos acuáticos tienen la capacidad de acumular metales sin que esto les cause un daño aparente. De esta forma, concentraciones de metales pueden ingresar a la cadena alimenticia y causar daños considerables al consumidor final (Gu et al., 2015b)

El Cobre puede ser liberado en el medioambiente tanto por actividades humanas como por procesos naturales. Ejemplo de fuentes naturales son las tormentas de polvo, descomposición de la vegetación, incendios forestales y aerosoles marinos. El sulfato de cobre se utiliza como alguicida y molusquicida en el agua, y como fungicida vegetal, mezclado con cal.

El cinc rara vez se encuentra en la naturaleza en su estado metálico, pero muchos minerales contienen cinc como componente principal. La mayoría del cinc es vertido durante actividades industriales, como la minería, la combustión de carbón y residuos y el procesado del acero (Molony, 2001) Los peces presentes en el agua pueden acumularlo y transmitirlo a lo largo de la cadena alimentaria

Los estudios realizados indican que las prácticas agrícolas y acuícolas representan unas de las principales fuentes de contaminación del suelo y agua en metales altamente tóxicos como el mercurio (Hg), cadmio (Cd), cobre (Cu) y zinc (Zn). Si esos metales llegan al medio ambiente y se acumulan a concentraciones críticas que pueden desencadenar co-selección de resistencia a los antibióticos. Además, se han descrito mecanismos de co-selección de estos metales pesados, así como a antibióticos de uso veterinario. Por lo tanto, los estudios que investigan la co-selección en entornos afectados por la agricultura y la acuicultura deben centrarse en Hg, Cd, Cu y Zn como la selección de los metales pesados (Seiler y Berendonk, 2012).

II.3.3.1.- Determinantes genéticos de resistencia a metales pesados

Los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plásmidos o transposones o en ambos (Tabla 5) (Von Rozycki y Nies, 2008; Amoroso et al., 2000).

Los determinantes plasmídicos que confieren resistencia a metales, poseen una gran especificidad, comparable con la que presentan los productos codificados por otros genes que intervienen en el metabolismo celular (Silver y Phung, 1996), y constituyen sistemas inducibles en la mayoría de los casos (Collard et al., 1993). Hasta el momento, se han descrito genes de resistencia a plata, arsénico, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, antimonio y cinc localizados en plásmidos (Silver y Phung, 1996; Shukla et al., 2006). Estos hallazgos son de vital importancia ya que los plásmidos generalmente confieren resistencia a elevadas concentraciones de metales (Mergeay, 1991) y pueden moverse fácilmente de una célula a otra por transmisión horizontal de material genético, de modo que contribuyen considerablemente en la adaptación a corto plazo de las comunidades microbianas en ambientes contaminados (Blattner et al., 1997; Nies et al., 1999).

Tabla 5. Determinantes genéticos de resistencia a metales localizados en plásmidos

Determinante genético	Metal al que confiere resistencia	Bacteria	Mecanismo involucrado
<i>ars</i>	As(V), As(III), Sb(III)	<i>E. coli</i>	Reducción enzimática de arseniato a arsenito (ArsC)
	Arsénico	<i>S. aureus</i>	Expulsión de arsenito y antimonio mediante ATPasa tipo P (ArsA/B)
<i>cad</i>	Cd(II), Zn(II)	<i>S. aureus</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (CadA)
<i>chr</i>	Cr(VI)	<i>C. metallidurans</i>	Eflujo mediante proteína de membrana (ChrA)
<i>cnr</i>	Co(II), Ni(II), Zn(II)	<i>C. metallidurans</i>	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CnrABC) Expulsión mediante transportador tipo CDF (CnrT)
<i>cop</i>	Cu(II)	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Oxidación mediante una enzima multicobre oxidasa (CopA)
		<i>C. metallidurans</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (CopF). Actividad oxidorreductasa (CopI) y multicobre oxidasa (CopA)
<i>czc</i>	Cd(II), Zn(II), Co(II)	<i>C. metallidurans</i>	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CzcABC) Expulsión mediante transportador tipo CDF (CzcD) Expulsión mediante ATPasa tipo P (CzcP)
<i>pbr</i>	Pb(II)	<i>C. metallidurans</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (PbrA) y captura intracelular (PbrD)
<i>mer</i>	Hg(II)	<i>C. metallidurans</i>	Proteínas de unión periplasmática (MerP), transporte al interior celular (Mer T) y reducción enzimática de Hg (II) a Hg(0) en el citosol (MerA)
<i>ncc</i>	Co(II), Ni(II), Cd(II)	<i>A. xylosoxydans</i>	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(NccABC)
	Cd(II), Zn(II), Co(II), Ni(II)	<i>C. metallidurans</i>	
<i>nre</i>	Ni(II)	<i>A. xylosoxydans</i>	Exporte del catión mediante una proteína de la familia MFS (NreB)
		<i>C. metallidurans</i>	
<i>nrp</i>	Ni(II)	<i>Enterobacter</i> sp.	Exporte del catión mediante las proteínas NrpA y NrpB
<i>sil</i>	Ag(I)	<i>Salmonella</i> sp.	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(SilCFBA) Secuestro mediante la proteína periplasmática de unión a plata (Sile). Expulsión mediante ATPasa tipo P (SilP)
		<i>C. metallidurans</i>	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(SilCBA)
<i>pco</i>	Cu(II)	<i>E. coli</i>	Captura (PcoE, PcoC) y oxidación (multicobre oxidasa PcoA), mediante proteínas periplásmica

Los determinantes de resistencia a metales localizados en cromosomas (Tabla 6), son en algunos casos muy similares a los plasmídicos. La existencia de genes de resistencia a metales en el cromosoma, soporta la hipótesis de que este carácter se ha convertido en vital para algunas bacterias. En contraste, la resistencia a metales codificada en plásmidos se ha encontrado en bacterias que habitan ecosistemas ocasionalmente contaminados con el metal, por lo que dicho carácter en esos casos, pudiera no ser esencial para los microorganismos, (Barzanti et al., 2007) sino que se le otorga un importante valor adaptativo.

Tabla 6. Determinantes genéticos de resistencia a metales localizados en plásmidos

Determinante genético	Metal al que confiere resistencia	Cepa bacteriana	Mecanismo involucrado
<i>cad</i>	Cd(II), Zn(II)	<i>C. metallidurans</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (CadA)
<i>cop</i>	Cu(II)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Oxidación mediante una enzima multicobreoxidasa (CopA)
<i>mer</i>	Hg(II)	<i>C. metallidurans</i>	
<i>cue</i>	Cu(II)	<i>E. coli</i>	Enzima multicobre oxidasa (CueO) Expulsión mediante ATPasa tipo P (CopA)
<i>znt</i>	Zn(II), Co(II)	<i>S. aureus</i>	Expulsión mediante transportador tipo CDF (RzcB)
	Zn(II), Cd(II)	<i>C. metalidurans</i>	Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA)
	Zn(II), Cd(II), Pb(II)	<i>E. coli</i>	Expulsión mediante transportador tipo CDF (ZitB). Expulsión mediante ATPasa tipo P (ZntA)
<i>cus</i>	Cu(II)	<i>C. metalidurans</i>	Expulsión mediante transportadores del tipo RND asociados a proteínas MFP y OMF(CusCBA). Unión del metal a proteínas (CusF)
	Cu(II), Ag(I)	<i>E. coli</i>	
<i>cup</i>	Cu(II)	<i>C. metalidurans</i>	Eflujo mediante ATPasa tipo P (CupA)
<i>nir</i>	Ni(II)	<i>K. oxytoca</i>	Eflujo del catión mediante las proteínas NirA (del tipo MFS) y NirC (del tipo RND)
<i>ncr-nre</i>	Ni(II), Co(II)	<i>H. alvei</i> <i>S. marcescens</i> <i>L. ferriphilum</i>	Eflujo del catión mediante una proteína de la familia MFS (NreB) Captura del metal (NcrC)

Los genes que controlan la resistencia a metales asociados a plásmidos, proporcionan a las bacterias una ventaja competitiva frente a otros organismos cuando los metales están presentes. Las bacterias Gram-positivas suelen ser más sensibles a los metales tóxicos que las Gram-negativas (Sterritt y Lester, 1980). Aunque dentro de un mismo grupo se han descrito diferencias, como por ejemplo el crecimiento de una cepa de *Aeromonas* se inhibe a una concentración de 100 µg/ml de Zn, mientras que otra cepa del mismo género aislada del mismo sitio de muestreo tiene la capacidad de crecer hasta una concentración de 3200 µg/ml de Zn (Matyar et al., 2010).

La aparición de plásmidos de resistencia a múltiples fármacos que llevan asociados genes de resistencia a metales pesados es alarmante y requiere una vigilancia adicional. La co-localización de genes de resistencia a los antimicrobianos y genes que confieren resistencia a los metales pesados pueden facilitar su persistencia, co-selección, y difusión.

Las sales metálicas se utilizan para la descontaminación en piscicultura. El cobre y el zinc se utilizan con frecuencia en la acuicultura y también como pinturas antiincrustantes en los barcos (Yebra et al., 2004; Watermann et al., 2005; Guardiola et al., 2012). El cobre puede ser liberado al medio ambiente tanto por las actividades humanas como por los procesos naturales. El zinc raramente se encuentra en la naturaleza en su estado metálico, pero muchos minerales contienen zinc como componente principal. Las principales fuentes antropogénicas de zinc son la minería, las instalaciones de producción de zinc, la producción de hierro y acero, la corrosión de estructuras galvanizadas, el carbón y la combustión de combustibles, la eliminación e incineración de desechos y el uso de fertilizantes y plaguicidas que contienen zinc (OMS, 2001). Los peces pueden acumular y transmitir metales pesados a lo largo de la cadena alimentaria. Los genes que controlan la resistencia a los metales pueden estar asociados con plásmidos, que proporcionan a las bacterias una ventaja competitiva sobre otros organismos cuando están presentes metales específicos (Trevors et al., 1985; Hobman y Crossman, 2014). La aparición de plásmidos con múltiples resistencias a los metales pesados es alarmante y requiere un control adicional (Gómez-Sanz et al., 2013). La co-localización de los genes de resistencia a los metales y de resistencia a los antimicrobianos puede facilitar su persistencia, co-selección y diseminación (Gómez-Sanz et al., 2013; Wales y Davies, 2015).

Debido a la alta incidencia de bacterias resistentes a metales pesados en diversos ambientes, marinos, ríos y suelos agrícolas (Sabry et al., 1997; Ansari et al., 2008; Malik y Aleem, 2011), se puede pensar que el agua contaminada con contaminantes industriales (por ejemplo, metales pesados) pueda aumentar también la selección de bacterias resistentes a los antibióticos y viceversa (An et al., 2010; Matyar 2012; Zhao et al., 2012).

OBJETIVOS

La resistencia a antibióticos es un tema cada vez más preocupante en el ámbito de la salud pública. Aunque está claramente establecido que hay una relación directa entre el uso de antibióticos en humanos y el desarrollo de resistencias, la contribución de la exposición de los microorganismos a agentes antimicrobianos fuera del ámbito clínico al desarrollo y la prevalencia de cepas multirresistentes empieza a ser considerada cada vez más relevante. En la Naturaleza, así como en los ambientes antropogénicos, los microorganismos están expuestos a multitud de agentes antimicrobianos frente a los cuales se seleccionan mecanismos de resistencia o tolerancia que permiten a las cepas en cuestión sobrevivir y multiplicarse en presencia de los mismos. Cuando confluye una exposición múltiple a agentes antimicrobianos de diferentes categorías, los microorganismos tienen a acumular mecanismos de resistencia de forma que, tras ser expuestos a uno de los agentes, se mantiene también la resistencia para los demás. Antibióticos, biocidas con diferentes estructuras químicas, antimicrobianos naturales, conservantes y metales pesados son ejemplos significativos. La transmisión de cepas multirresistentes a través de los alimentos y la exposición a posibles cepas patógenas o portadoras de resistencias en los entornos antropogénicos donde se elaboran las materias primas o se procesan los alimentos son cuestiones de interés para la salud pública. Aunque la resistencia a agentes antimicrobianos en determinados ámbitos de la industria alimentaria (sobre todo la industria cárnica, láctea y productos avícolas) ha sido investigada en profundidad, existen aun pocos estudios relacionados con la industria del pescado. En el caso del pescado la mayoría de los estudios se han centrado en la inhibición de *L. monocytogenes* en los productos del mar, mientras que otras bacterias patógenas o bacterias causantes putrefacción (como *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas* spp. o *Pseudomonas* spp.) han sido mucho menos estudiadas aunque siguen siendo un motivo de preocupación.

Atendiendo a los antecedentes expuestos anteriormente, a la hora de plantear este estudio se definieron los siguientes **objetivos**:

- 1.- Determinar la incidencia de tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos en bacterias procedentes de productos de pesca.

2.- Identificar los microorganismos con mayor incidencia de resistencias a antibióticos y biocidas, y determinar su tolerancia a otros antimicrobianos como conservantes químicos, compuestos fenólicos, o metales pesados.

3.- Conocer los determinantes genéticos de resistencia.

4.- Determinar la posible correlación entre resistencias a diferentes agentes antimicrobianos.

5.- Conocer la biodiversidad bacteriana en una granja de tilapia como modelo de fuente antropogénica para potenciales microorganismos patógenos, productores de toxinas, o portadores de resistencias.

TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

ARTÍCULO 1

**José Luis Romero García, M^a José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido,
Antonio Gálvez, Rosario Lucas.**
Resistencias a biocidas de cepas aisladas de diferentes pescados
Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía
***Oriental*. (Vol 29, 2016, en prensa)**

“RESISTENCIAS A BIOCIDAS DE CEPAS AISLADAS DE DIFERENTES PESCADOS”

José Luis Romero García, M^a José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Rosario Lucas

Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: agalvez@ujaen.es

RESUMEN

Se ha aislado una colección de cepas de diferentes muestras de pescado fresco y marisco, y se ha determinado la resistencia a diferentes biocidas. En la mayoría de los productos de la pesca estudiados, las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo están entre 10^3 y 10^7 . En el estudio morfológico predominan los bacilos Gram -, salvo en productos donde la manipulación ha sido más importante que encontramos cocos Gram +. Respecto a los ensayos de resistencia a biocidas, hay mayor número de cepas resistentes para triclosán, oxonia, cloruro de benzalconio y hexadecilpiridinio. En general, la resistencia a biocidas es baja.

Palabras clave: pescado, biocidas, resistencias

ABSTRACT

A collection of bacterial strains isolated from raw seafood has been studied regarding its biocide tolerance. Viable bacterial counts obtained for most samples analyzed ranged from 10^3 to 10^7 colony forming units (CFU) per gram. Most isolates were Gram-negative bacilli, except for raw processed products where Gram-positive bacilli were more abundant. Highest percentages of biocide tolerance were obtained for triclosan, oxonia, benzalkonium chloride and hexadecylpyridinium chloride. In general, biocide tolerance is low.

Keywords: seafood, biocides, antimicrobial resistance

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PESCADO

Los peces y sus productos derivados constituyen una importante fuente de proteína de alto valor biológico, de grasa y vitaminas liposolubles. Debido al incremento de la población mundial y a la mejora de los índices de desarrollo de muchos países, la producción de alimentos proteicos experimenta una demanda creciente. La producción pesquera mundial, supone el tercer alimento proteico de origen animal en cantidad bruta después de la leche y la carne y el segundo en el aporte de proteína neta después de la carne (1). La producción pesquera mundial ha aumentado de forma constante en las últimas cinco décadas y el suministro de peces comestibles se ha incrementado a una tasa media anual del 3,2 %, superando así la tasa de crecimiento de la población mundial del 1,6 % (2).

El consumo *per capita* de pescado en España ronda los 43 Kg anuales, frente a una media europea de 22,1 Kg y media mundial de 18,4 Kg (3). El balance entre importaciones y exportaciones también nos indica que se realiza un comercio importante de pescado, en 2009 las importaciones fueron de 2.061.448 toneladas y las exportaciones de 1.127.908 toneladas.

1.2. MICROORGANISMOS DEL PESCADO

La piel de los peces contiene abundantes microorganismos capaces de crecer y sobrevivir a bajas temperaturas, incluso inferiores a 10 °C. Las bacterias existentes en el intestino contribuyen junto con las de la piel a la descomposición del pescado (4). La vida útil de los productos de la pesca depende de la rapidez con la que se produzca el deterioro después de la muerte. Son productos muy perecederos debido a los siguientes factores: características físico-químicas de la matriz, alta actividad agua, pH neutro, su composición lipídica, enzimas autolíticas y microorganismos en la superficie corporal (5). Los peces son animales poiquilotérmicos, por tanto, la flora predominante refleja mucho la del medio que circunda al pez vivo (6).

La microbiota de los peces de aguas frías de las regiones árticas y templadas consiste fundamentalmente en psicrófilos aerobios Gram - y psicrotrofos (7). La mayor parte son psicrófilos, capaces de crecer a temperaturas de hasta -5 °C o -6 °C. Por tanto, aunque están inicialmente en cantidades bastante pequeñas, pueden crecer rápido

durante su almacenamiento en frío para alcanzar cifras de 10^5 a 10^7 UFC/g (de tejido branquial), en 7 días.

Los olores del pescado alterado son el resultado de la utilización bacteriana de moléculas relativamente pequeñas e hidrosolubles del tejido del pescado, especialmente de los constituyentes del nitrógeno no proteico de los tejidos: aminoácidos, péptidos pequeños y óxido de trimetilamina (4). Otros productos del metabolismo bacteriano que contribuyen a la percepción sensorial de la alteración son: ácidos grasos de cadena corta (ácido láctico, ácido butírico), aldehídos y cetonas de los lípidos tisulares, sulfuros volátiles (sulfuro de hidrógeno, sulfuro de dimetilo, mercaptano de metilo), aminas (indol, escatol), aminas biógenas (histamina, putrescina y cadaverina) y amoníaco procedente de los aminoácidos o proteínas degradadas (8). La producción bacteriana de enzimas proteinasas está reprimida al principio pero se acelera en las últimas fases debido al aumento en el *pool* de aminoácidos procedentes de la hidrólisis de proteínas.

La microbiota inicial del pescado depende del ambiente y de su entorno en el momento de la pesca. La microbiota de peces vivos de aguas frías y templadas es muy constante, predominando Gram- como: *Psychrobacter* (*Moraxella*), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella* (*Alteromonas*), *Flavobacterium*, *Cytophaga* y *Vibrio*. Normalmente hay pequeño número de Gram+ como *Micrococcus* y *Corynebacterium*. En aguas cálidas, entre el 50 y 60 % de la microflora es Gram+, de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* (6). En la piel y agallas predominan las bacterias aerobias facultativas, encontrando bacterias del género *Vibrio*, en peces pelágicos (caballa, arenque, sardina, etc.) en concentraciones elevadas. En intestino abundan anaerobias obligadas. En los pescados de agua dulce hay los mismos tipos de bacterias, salvo que *Aeromonas* sustituye a *Vibrio*.

Los microorganismos patógenos del pescado crudo refrigerado son los mismos que la microbiota original y los adquiridos en las primeras fases de la pesca. En pescado entero hay *Clostridium botulinum*, tipos E y B y F no proteolíticos. Pueden crecer a temperaturas bajas, a partir de 3,3 °C, por tanto hay que tener cuidado con pescado envasado al vacío y en atmósferas modificadas mantenido a una temperatura mayor de 3 °C. En los pescados que no se cuida la cadena de frío y se mantengan a una temperatura mayor de 10 °C crecen bien microorganismos patógenos como: *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp. En aguas cálidas puede haber altos recuentos de

Vibrio spp. Este género incluye algunas especies que pueden provocar septicemias graves.

En las truchas criadas en estanques se pueden encontrar altas concentraciones de *Clostridium botulinum*. Pueden aparecer patógenos entéricos (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.) en balsas enriquecidas con estiércol y también debido a los piensos, anfibios y aves. En ahumados puede encontrarse *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. botulinum*. Si la temperatura no ha sido suficientemente alta y hay una mala conservación a temperatura alta puede dar problemas *C. botulinum* tipo E, en el ahumado en caliente se inactivan esporas de *C. botulinum* no proteolítico pero no las proteolíticas (7).

Las infecciones por consumo de alimentos contaminados continúan siendo una constante relevante en el ámbito sanitario de la Unión Europea. En 2011 se detectaron un 16.1% de infecciones por consumo de diferentes pescados el ámbito de la Unión Europea (9). En el sector pesquero hay también preocupación creciente por el incremento de cepas resistentes o multirresistentes a los agentes antimicrobianos en la cadena alimentaria (9, 10, 11).

1.3. BIOCIDAS (DESINFECTANTES)

Según el Reglamento (UE) 528/2012 (12) se definen los biocidas como “toda sustancia o mezcla, en la forma en la que se suministra al usuario, que esté compuesta por, o genere una o más sustancias activas, con la finalidad de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o de ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una mera acción física o mecánica”.

La acción de los biocidas dependerá del tipo de microorganismos sobre el que queramos actuar, debido a sus diferentes características fisiológicas, metabólicas. El mecanismo de acción de los biocidas se fundamenta en que actúan sobre las moléculas de la membrana de la célula viva, especialmente sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos (fosfolípidos), ácidos nucleicos y sobre otras pequeñas moléculas, como algunas vitaminas, hormonas y ciertos elementos minerales esenciales presentes en las células (13, 14). Al actuar sobre diferentes dianas, es muy difícil determinar cuáles son los efectos concretos que provocan o contribuyen a la muerte del microorganismo. Principalmente interaccionan con la superficie celular, pero una vez dentro del microorganismo, puede dañar uno o más componentes celulares, mediante tres

mecanismos de acción: Envenenamiento de los sistemas enzimáticos, Alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular o Coagulación y precipitación de proteínas celulares.

El uso de biocidas en la piscicultura, en virtud de los requisitos previos de la Directiva 98/8/ CE, permite una gama de desinfectantes para la descontaminación en la cría de peces, o para estanques y equipos como son yodóforos, sales metálicas, compuestos halo orgánicos, aldehídos, peróxido de hidrógeno, compuestos de amonio cuaternario, y colorantes antimicrobianos.

Una preocupación creciente es el uso de biocidas, ya que puede provocar co-selección de cepas resistentes a antibióticos de uso clínico, como se ha comprobado en el caso del triclosan y otros (15, 16, 17, 18). Los biocidas son ampliamente utilizados en la desinfección de equipos e instalaciones. En bacterias Gram-negativas se han descrito numerosos genes de resistencia a biocidas derivados del amonio cuaternario (QAC), que también están ampliamente diseminados en las bacterias Gram-negativas (19, 20, 21).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO DE CEPAS PROCEDENTES DE PESCADO

Se ha aislado una colección de cepas a partir de 14 especies de pescado y productos del mar, boquerón (*Engraulis encrasicolus*), sardina (*Sardina pilchardus*), jurel (*Trachurus trachurus*), caballa (*Scomber scombrus*), lenguado (*Solea* spp.), dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), salmón (*Salmo salar*), merluza (*Merluccius capensis*), tintorera (*Prionace glauca*), calamar (*Loligo* spp.), mejillón (*Mytilus edulis*), langostino (*Penaeus* spp.) y cigala (*Nephrops norvegicus*).

Se pesaron 25 gramos de cada una de las muestras de pescado. Dependiendo del tipo de pescado se seleccionaron distintas zonas de la toma de muestra. Teniendo en cuenta zonas con piel, sin piel, cola, cabeza, estómago, etc. En una bolsa estéril se mezclaron con 225 ml de peptona salina, con el fin de homogeneizar la muestra. Se masajeó el contenido durante 2 minutos para desprender los microorganismos, y se dejó reposar para que se depositaran los restos de pescado. Con el sobrenadante obtenido se prepararon diluciones para el recuento de microorganismos, manteniéndolas en frío hasta su uso.

Cada dilución se sembró en su placa correspondiente de medio TSA salino, siempre por triplicado con la espátula de Drigalski estéril. Se incubaron a 30 y 37°C, durante 24 horas. Pasadas las 24h se observaron las colonias y se hizo el recuento de

células viables por la técnica del número de unidades formadoras de colonias UFC/ml o g. de muestra de pescado ensayada. Se seleccionaron las colonias perfectamente aisladas, y se realizó la tinción de Gram para poder clasificar las cepas según su morfología. Se congelaron a -80° para los posteriores ensayos.

2.2. ENSAYO DE RESISTENCIA A BIOCIDAS, MICROTITULACIÓN.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante la noche. Para el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias de los biocidas sometidos a estudio se han distribuido en placas de microtitulación los biocidas a ensayar junto con diluciones de cultivos estacionarios de las diferentes cepas.

- Biocidas utilizados:
 - **Cloruro de benzalconio**: 50% en agua (Fluka. Sigma-Aldrich Chemic GmH).
 - **PHMG** (polyhexamethylene guanidine hydrochloride; Oy Soft).
 - **Oxonia** (Ácido P3-oxonia).
 - **Hexaclorofeno**, 99%. (Aldrich Chemical Co. Ltd.).
 - **Hexadecilpiridinio**: 99,0-102,0% (Sigma Aldrich, Co.).
 - **Triclosan** (Irgasan): $\geq 97,0\%$ HPLC. 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol (Sigma Aldrich, Co.).
 - **Cetrimida**, Alkytrimethyl-ammonium bromide. Soluble en agua al 10%. (Sigma Aldrich, Co.).
 - **Clorhexidina digluconato** 20% en agua. (Sigma Aldrich, Co.)

Técnica de microtitulación

Se preparan distintas diluciones de los biocidas en medio nutritivo líquido estéril, TSB. En la dilución al 10% del hexaclorofeno y del triclosan se utiliza alcohol etílico de 96° para facilitar la disolución del compuesto. En cada pocillo de la placa de microtitulación se añaden 200 µl de la dilución del biocida, desde C1 a C5 y se inoculan con 20 µl de la dilución 1/10 del cultivo overnight de cada cepa. En todos los ensayos se pone un control positivo, y controles negativos del medio TSB y de los diferentes biocidas, Se incuban a 37 °C o 30 °C, según crecimiento de cada cepa, durante 18-24 horas. A las

24 h se procede a la lectura de la microplaca con el lector "Microplate Reader" (BIO-RAD) a 595 nm.

3. RESULTADOS

3.1. AISLAMIENTO DE COLONIAS: OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS.

Se han aislado 73 cepas del conjunto de las especies de pescado muestreadas. Para el posterior estudio dichas cepas se han agrupado dependiendo del tipo de pescado del que proceden (Tabla 1).

Una vez realizada la toma de muestra como se refleja en el apartado de material y métodos se procedió al recuento de UFC/g y a la identificación de las muestras y clasificación mediante la tinción de Gram. En la tabla 2 se pueden observar los distintos pescados ensayados, las zonas de muestra y los resultados obtenidos.

La concentración de microorganismos viables encontrada es muy variable dependiendo de cada producto, oscilando desde $1,5 \times 10^3$ UFC/g en mejillón fresco hasta $7,2 \times 10^7$ UFC/g en salmón, presentado en una rodaja envasada en bandeja de poliestireno cubierta por film en vitrina refrigerada. En general, los productos de pesca extractiva y moluscos tienen menor carga bacteriana, oscilando entre 10^3 a 10^4 UFC/g, la excepción es el jurel con $1,8 \times 10^6$ UFC/g, en estos niveles se sitúa también la tintorera; los productos de la acuicultura y el marisco cocido están próximos a 10^5 UFC/g, similar a la rodaja de merluza; y la carga microbiana mayor se ha encontrado en la dorada, la muestra de la parte de la ventresca con piel con 10^6 UFC/g y el salmón, como hemos comentado ya, con 10^7 UFC/g (Tabla 2).

En el trabajo de aislamiento y recuperación de cepas en medio líquido realizado a lo largo de los días, se observó que muchas cepas dejaban de crecer a 37 °C, creciendo a 30°C. Las cepas con un crecimiento óptimo mesófilo (37 °C) se han aislado de los productos presentados en rodajas y trozos, además de algunas en marisco cocido y en algunos productos de pesca extractiva y acuicultura como caballa, dorada y lubina. Del total de cepas el 52% han crecido a 30 °C y el 48% a 37 °C (Tabla 2).

La morfología de las colonias observada en medio sólido sobre placa de TSA, es bastante homogénea, todas las colonias han sido circulares y de elevación entre convexa (la mayoría) y plana. Se han encontrado tres tipos claramente diferenciados respecto al color: colonias blancas mucosas, colonias con tonalidad amarillenta, y colonias transparentes o translúcidas.

Por último, el estudio mediante la tinción de Gram nos muestra el predominio de los bacilos Gram -. Los bacilos Gram - son los predominantes en los productos procedentes de la pesca extractiva, de la acuicultura y los moluscos. El otro grupo predominante son los cocos Gram +, encontrados en el grupo de las rodajas y trozos de pescado y en el marisco cocido. En menor cantidad aparecen algunos bacilos Gram + (Tabla 2).

3.2. ENSAYOS DE RESISTENCIAS A BIOCIDAS

En el cómputo global, las cepas de pescado evaluadas no son resistentes a las concentraciones de 1% y 0,25% de los desinfectantes ensayados, tan solo un 8,22% son resistentes a la concentración de 0,25% de triclosán (TRI). A la concentración de 0,025% se encuentran cepas resistentes a varios de los biocidas ensayados salvo a la cetrimida (CETRI), polihexametilen guanida (PHMG) y hexaclorofeno (HCF). Las cepas son más resistentes según el siguiente orden: triclosán (TRI) con un 10,95%, oxonia (OX) con un 4,1%, cloruro de benzalconio (CLB) con un 2,74% y hexadecilpiridinio (HDP) con un 1,37%. Para el resto de biocidas solo se detectaron cepas resistentes a concentraciones mucho más bajas (Figura 1).

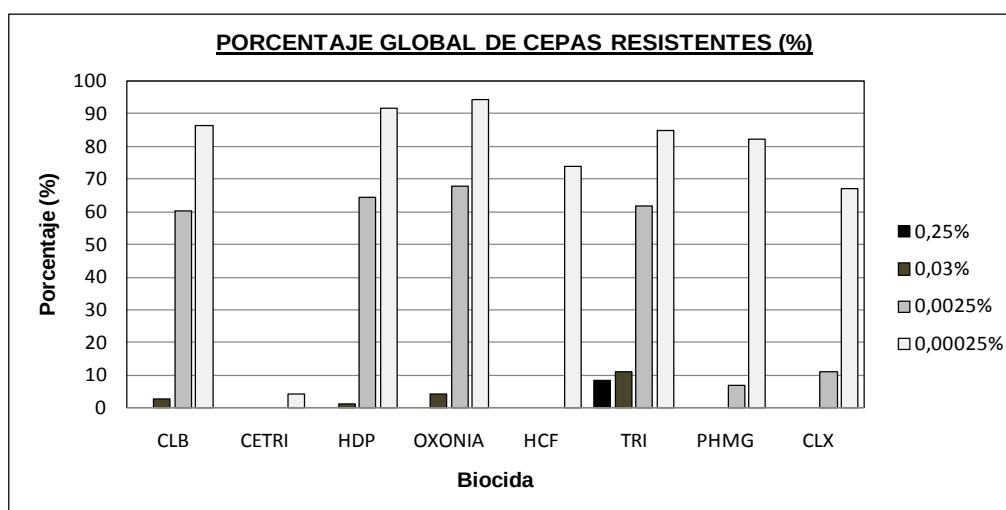


Figura 1: Porcentaje global de cepas tolerantes a las diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio (CLB), Cetrimida (CETRI), hexadecilpiridinio (HDP), oxonia, hexaclorofeno (HCF), triclosán (TRI), polihexametilen guanidina (PHMG), o clorhexidina digluconato (CLX).

Al observar los resultados, según las categorías en las que se han agrupado los productos de la pesca utilizados en el estudio, tenemos:

1. Cepas procedentes de la pesca extractiva: sardina, boquerón, caballa y jurel. En general son cepas poco resistentes, encontrando sin embargo en este grupo las más resistentes a la concentración de 0,25% al triclosán. A la concentración de 0,025% hay cepas resistentes al cloruro de benzalconio, oxonia y triclosán. A la concentración de 0,0025% aproximadamente la mitad de las cepas de esta categoría son resistentes, aunque variando según biocida, mayor al cloruro de benzalconio, triclosán, oxonia, hexadecilpiridinio y polihexametilen guanidina.

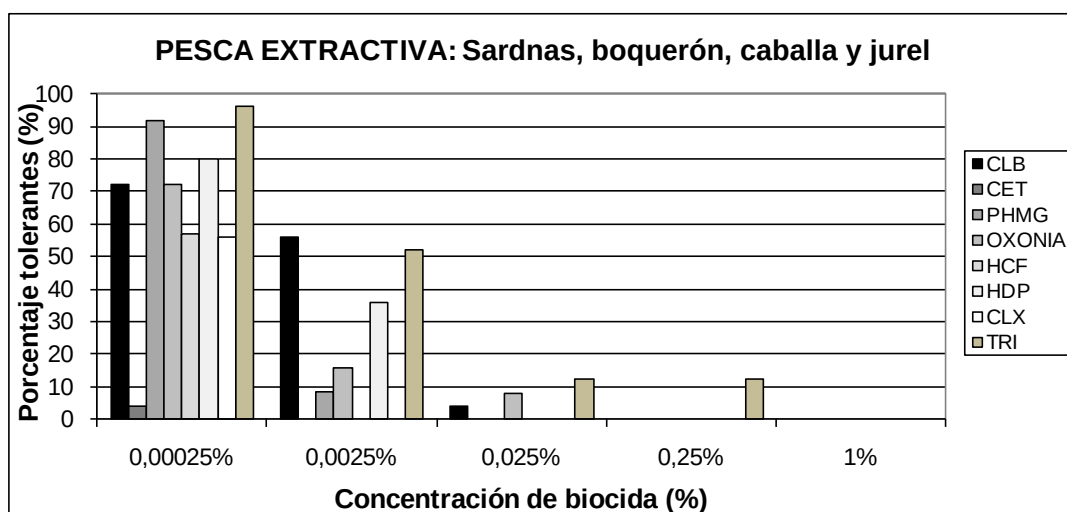


Figura 2. Porcentaje de cepas procedentes de pesca extractiva tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

A la menor concentración ensayada, 0,00025%, la resistencia es mayor, exceptuando la cetrimida (Figura 2).

2. Cepas procedentes de la acuicultura: lenguado, dorada, lubina. La distribución de resistencia a los biocidas, entre las cepas aisladas de esta categoría, es muy similar a la de la pesca extractiva. No hay resistencia a la concentración del 1%, a la concentración de 0,25% hay un 19% de las cepas de esta categoría resistentes al triclosán. A la concentración de 0,025% no hay crecimiento bacteriano en los derivados del amonio cuaternario, poliguanidas y hexaclorofeno. A la concentración de 0,0025% el porcentaje de crecimiento bacteriano oscila entre el 50% para cloruro de benzalconio y triclosan y el 13% para polihexametilen guanida. Finalmente, a la concentración de 0,00025% los porcentajes de crecimiento son muy altos salvo para cetrimida (Figura 3).

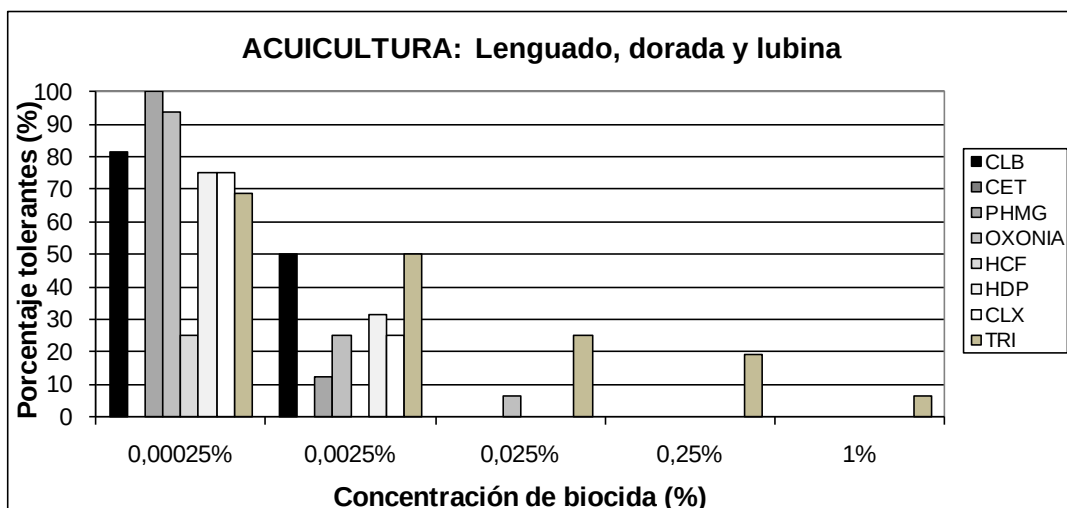


Figura 3. Porcentaje de cepas de acuicultura tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

3. Cepas procedentes de productos presentados en rodajas y en trozos: salmón, merluza y tintorera. Las 16 cepas de este grupo tienen un comportamiento muy homogéneo. No hay crecimiento a las concentraciones de 1% y 0,25%. Al 0,025% se detectan porcentajes muy bajos de cepas resistentes a cloruro de benzalconio y triclosan. Estos biocidas, junto con el hexadecilpiridinio, mantienen porcentajes de resistencia muy altos al 0,0025%. Todos los biocidas (excepto cetrimida) muestran porcentajes muy altos de resistencia al 0,00025% (Figura 4).

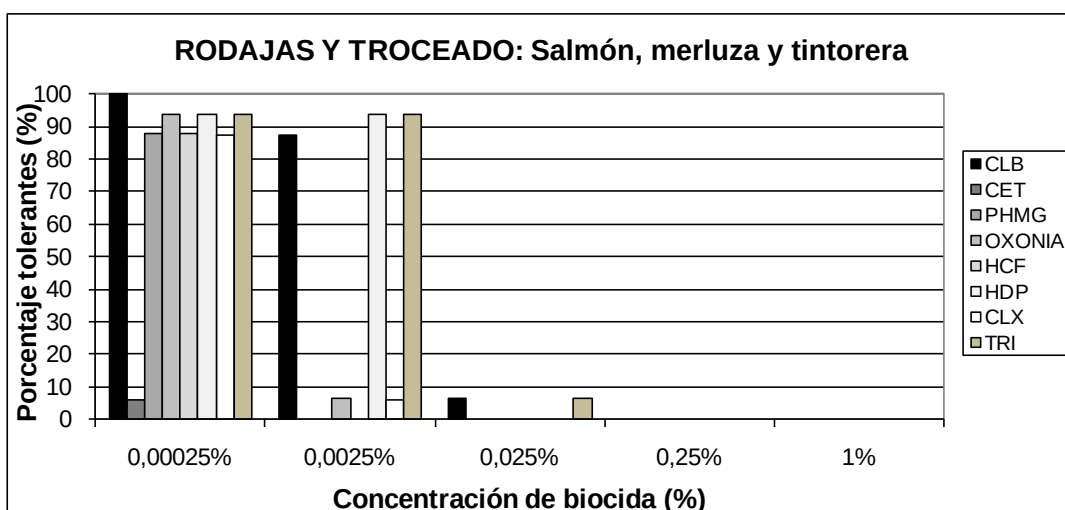


Figura 4. Porcentaje de cepas aisladas de la presentación en rodajas y troceado tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

4. Cepas procedentes de moluscos: calamar y mejillón. En esta categoría solo se incluyen 6 cepas aisladas. El comportamiento ante los biocidas ha sido muy similar al grupo anterior. No hay crecimiento a las concentraciones de biocida del 1% y 0,25%. Sin embargo el 17% de las cepas han crecido a la concentración de 0,025% frente al triclosán. Al 0,0025% se observa alta resistencia para cloruro de benzalconio, hexadecilpiridinio y triclosan. Al 0,00025%, todas las cepas son resistentes para los biocidas cloruro de benzalconio, oxonia, hexadecilpiridinio, clorhexidina y triclosan. También se encuentran niveles muy altos de resistencia para polihexametilen guanida y hexaclorofeno, y ligeramente altos para cetrimida (Figura 5).

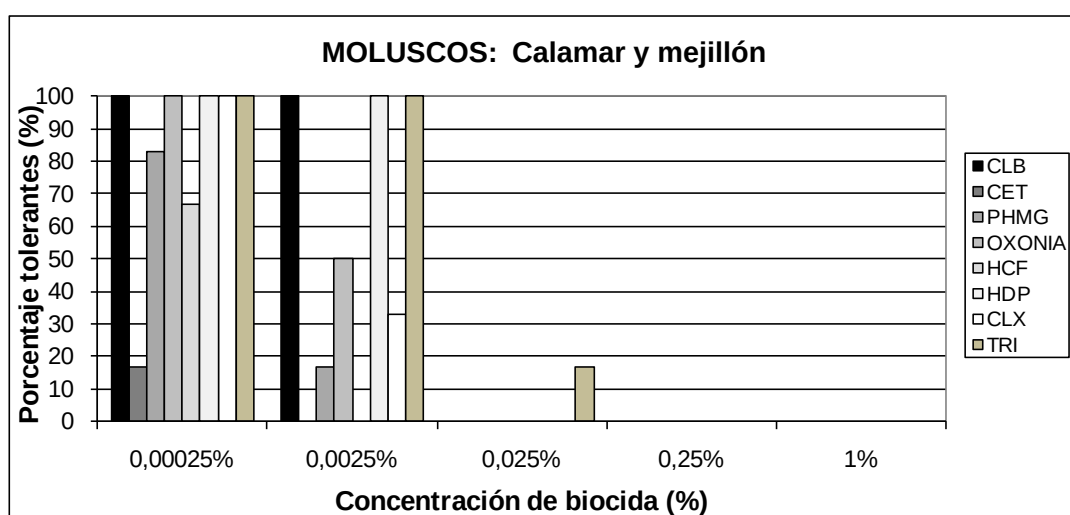


Figura 5. Porcentaje de cepas de moluscos tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

5. Cepas procedentes de marisco cocido: langostino y cigala. Se han ensayado 10 cepas. No hay crecimiento a las concentraciones del 1% y 0,25%. Al 0,025% se han encontrado resistencias para clorhexidina y triclosan. A la concentración de 0,0025%, las resistencias van del 50% para polihexametilen guanida al 10% para oxonia. Al 0,00025% se encuentran resistentes para todas las cepas (Figura 6).

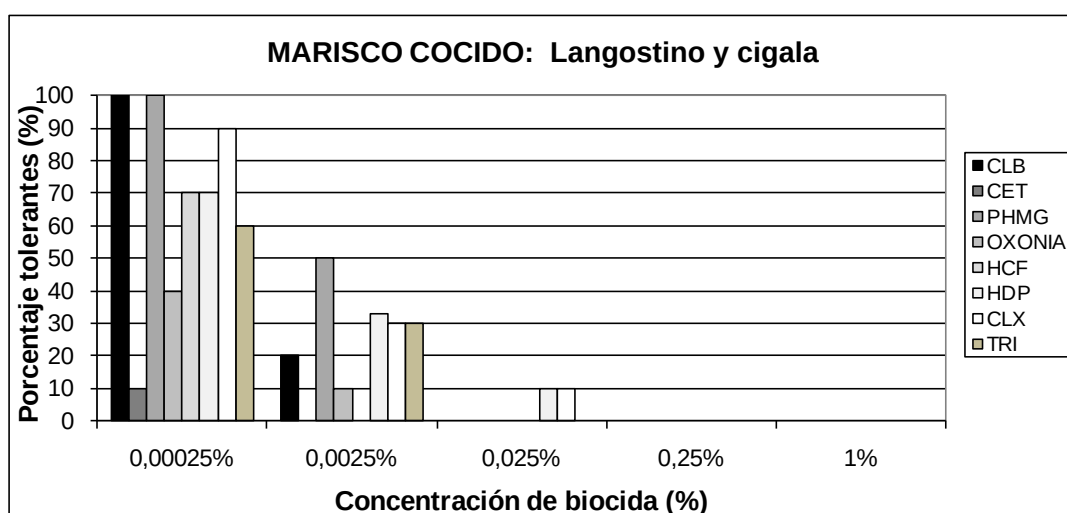


Figura 6. Porcentaje de cepas de marisco cocido tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

4. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran la presencia de bacterias resistentes a biocidas en las diferentes muestras de pescado ensayadas. El 64% de las cepas aisladas son bacterias Gram negativas, según estudios anteriores, las bacterias Gram negativas son generalmente más tolerantes que las bacterias Gram-positivas a los agentes antibacterianos (22, 23), datos que concuerdan con nuestros resultados donde la mayor resistencia a biocidas se produjo en las bacterias Gram-negativas. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas actúa como una barrera responsable de la resistencia intrínseca de estos microorganismos para muchos compuestos antimicrobianos (24, 25). Tal resistencia a la permeabilidad mediada depende en una medida considerable, no sólo del agente en cuestión, sino también del tipo de microorganismo. La membrana externa de los miembros de la familia Enterobacteriaceae (y otras bacterias Gram-negativas, en particular *Pseudomonas aeruginosa*) actúa como una barrera que limita o impide la entrada de muchos agentes antibacterianos (24, 25).

En los resultados obtenidos un 8,20%, de las cepas aisladas son resistentes a la concentración de 0,25% de triclosán (TRI). El triclosan (5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi) fenol) es una biocida ampliamente utilizado en jabones de tocador, pasta de dientes, jabones líquidos, plásticos de uso doméstico, desodorantes, telas, champús, una gran variedad de productos de cuidado personal y productos comerciales para limpieza de superficies, así como incorporado en materiales como tablas de cortar, o

embalajes. Tiene un amplio espectro frente a muchos microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas, algunos hongos, y micobacterias (26). Las bacterias resistentes a triclosan son abundantes en naturaleza, y existen muchos mecanismos de resistencia conocidos, (27, 28, 29, 30). Recientemente se han descrito genes de resistencia presentes en *Escherichia coli* (31). *Pseudomonas aeruginosa* (32), *Salmonella enterica* serovar typhimurium (33), *Staphylococcus aureus* (34), *Mycobacterium smegmatis* (28), o *Acinetobacter baumannii* (35).

Aparte del Triclosan, se ha detectado también un bajo porcentaje de cepas con altos niveles de resistencia a oxonia, cloruro de benzalconio y hexadecilpiridinio, Atendiendo a la literatura científica, dentro de las bacterias Gram-negativas que son particularmente resistentes a varios biocidas destacan *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *Proteus* spp. y *Providencia stuartii* (22). *P. aeruginosa* tolera altos niveles de derivados del amonio cuaternario y es también menos susceptible que otros muchos tipos de bacterias Gram-negativas a diacetato de clorhexidina (CHA). Aparte de en los alimentos, otros estudios han detectado la presencia de cepas de *Listeria monocytogenes* y *E. coli* resistentes al uso prolongado de derivados de amonio cuaternario en una planta de procesamiento de pescado noruego (36). En los mataderos de cabra y cordero, se han detectado también especies de *Pseudomonas* resistentes a antibióticos y biocidas, aisladas de todas las superficies de producción de la cadena de la carne así como en los productos cárnicos (37).

En la industria alimentaria moderna, la escala de la producción de alimentos aliada a las demandas de los consumidores de alimentos sanos, nutritivos, y mínimamente procesados carente de aditivos, tales como conservantes químicos y otros agentes antimicrobianos, ha tenido un impacto importante en el número de biocidas utilizados en este entorno. En un intento de mejorar las medidas de higiene y garantizar la seguridad alimentaria, la industria alimentaria ha aumentado la utilización de biocidas y desinfectantes basados en productos químicos para el control de la ecología microbiana del entorno de producción (38), incrementándose la tolerancia bacteriana a la mayoría de los agentes. Una exposición mayor a los biocidas puede dar lugar a bacterias resistentes que pueden ser transmitidas por los alimentos, lo que puede tener implicaciones importantes para la salud pública. Esta característica, sin duda, pone en peligro el papel de los desinfectantes como un medio eficaz para controlar microorganismos. La tolerancia adquirida a estos agentes podría facilitar la supervivencia de microorganismos patógenos y contribuir a la aparición de cepas resistentes.

Los datos obtenidos en este estudio indican la presencia de cepas resistentes a algunos de los biocidas utilizados en la industria alimentaria, siendo mayor en los pescados en rodajas y en trozos como salmón, merluza y tintorera, donde el contacto con superficies y el manejo es mayor. Debido a que no existen muchos datos sobre la resistencia de antimicrobianos en cepas procedentes de pescado, sería conveniente profundizar en este tipo de estudios, con el fin de poder conocer mejor los riesgos de selección de cepas resistentes y adoptar medidas de higiene que permitan producir alimentos de mayor calidad y seguridad alimentaria, así como aumentar la vida útil de productos altamente perecederos como el pescado.

5 BIBLIOGRAFÍA

- 1 FAO 2013. El estado mundial de la agricultura y la alimentación
- 2 FAO 2014. GLOBEFISH Highlights, 1/2014: 64.
- 3 FAO 2010. Anuario de estadísticas de pesca 2009. Tabla resumen. Producción de acuicultura 2010. Capturas 2010. Hojas de balance de alimentos.
- 4 Ruiter, A. 1999. El pescado y los productos derivados de la pesca composición, propiedades nutritivas y estabilidad. Ed. Acribia S.A.
- 5 Forsythe, F., Hayes, PR. 1999. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP 2007. 2ª edición. S.J.. Ed. Acribia, S.A.
- 6 Abaroa, MC., Pérez-Villarreal, B., Bald, C., Riesco, S., Picaza, N. 2008. Frescura del pescado-guía visual para su evaluación sensorial. AztiTecnalia.
- 7 Gram, L., Huss, H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products Int J Food Microbiol. 33: 121-137
- 8 Ibrahim, SM., Nassar, AG., El-Badry, N. 2008. Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging methods on some quality aspects of smoked mullet (*Mugil cephalus*). Global Vet. 2 (6):296-300.
- 9 EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 11:3129, 250 pp.

- 10 ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2013. Epidemiological update: multistate outbreak of *Salmonella* Stanley infection, 30 January 2013. Published 7 Feb 2013.
- 11 ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2012. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012.
- 12 Reglamento (UE) N° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y uso de los biocidas. DOUE L167 de 27-06-2012.
- 13 Gilbert, P., McBain, A.J. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev. 16: 189–208.
- 14 Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. 2010. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “resistance” has different meanings. Int J Food Microbiol. 136: 247–254.
- 15 Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, TT. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. Antimicrob Agents Chemother. 45: 428-432.
- 16 Braoudaki, M., Hilton, AC. 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 42:73–78.
- 17 Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, MA., Grande Burgos, MJ., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. 2012. Biocide tolerance in bacteria. Int J Food Microbiol. 162: 13-25.
- 18 López Aguayo, M.C., Grande Burgos, M.J., Lucas López, R., Gálvez, A. 2010. Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, 23: 121-136.
- 19 Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 56: 20–51.
- 20 Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Annals Med 39: 162–176.

- 21 Hansen, L.S., Jensen, L.B., Sorensen, H.I. 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. J Antimicrob Chemother. 60:145–147.
- 22 Russell, A.D., Gould, G.W. 1988. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. J Appl Microbiol. Symposium Supplement 65, 167S-195S.
- 23 Russell, A.D., Chopra, I. 1990. Understanding Antibacterial Action and Resistance, second ed. Ellis Horwood, Chichester, UK.
- 24 Nikaido, H., Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol Rev. 49; 1-32.
- 25 Gilbert, P., Pemberton, D., Wilkinson, D.E. 1990. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. J Appl Bacteriol. 69: 585–592.
- 26 Saleh, S., Haddadin, R.N., Baillie, S., Collier, P.J. 2010. Triclosan –an update. Lett. Appl. Microbiol. 52: 87-95.
- 27 Yazdankhah, S.P., Scheie, A.A., Hoiby, E.A., Lunestad, B.T., Heir, E., Fotland, T.O. 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. Microb. Drug Resist. 12: 83-90.
- 28 McMurry, L.M., McDermott, P.F., Levy, S.B. 1999. Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 711-713.
- 29 Russell, A.D. 2004. Whither triclosan? J. Antimicrob. Chemother. 53: 693-695.
- 30 McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B. 1998. Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 166: 305-309.
- 31 Yu, B.J., Kim, J.A., Pan, J.G. 2010. Signature gene expression profile of triclosan-resistant *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 65: 1171-1177.
- 32 Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff- Schweizer, R.R., Schweizer, H.P. 2001. Cross resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 428-432.

- 33 Bailey, A.M., Paulsen, I.T., Piddock, L.J. 2008. RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3604-3611.
- 34 Sorum, H., Abee-Lund TM, Solberg A, Wold A. 2003. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1285-1290.
- 35 Chen Y, Pi B, Zhou H, Yu Y, Li L. 2009. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Microbiol.* 58: 1086-1091.
- 36 Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. J.T Holah, JH Taylor, DJ, Dawson, KE Hall *Journal of applied microbiology* Volume 92, Issue s1 May 2002 Pages 111S–120S
- 37 Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Abriouel, H., 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int. J. Food Microbiol.* 161: 97-106.
- 38 Langsrud, S., Sidhu, M., Heir, E., Holck, A. 2003. Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *Int. Biodeter. Biodegr.* 51:283–290.

Tabla 1: Distribución del número de cepas aisladas de pescado en el presente estudio.

		Nº DE CEPAS		TOTAL			
FORMA DE VENTA	Pescado fresco	Entero	Pesca extractiva	SARDINA BOQUERÓN CABALLA JUREL	4 9 7 5	25	
			Acuicultura	LENGUADO DORADA LUBINA	5 5 6	16	
				Rodajas y troceado	SALMÓN MERLUZA TINTORERA	12 2 2	16
					Moluscos	MEJILLÓN CALAMAR	2 4
		Marisco cocido	LANGOSTINO CIGALA			4 6	10

Tabla 2. Resultados del aislamiento de colonias.

CATEGORÍAS	ALIMENTO	MUESTRA	UFC	Nº DE CEPA	Tª INCUB.	GRAM	MORF COLONIA
Pesca extractiva ENTERO	BOQUERÓN (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	Boquerón entero	1,9 X 10 ⁴	1	30	bacilos -	Grandes amarillas
				2	37	bacilos -	Medianas
				3	30	bacilos -	Pequeña amarilla
				4	37	bacilos +	Pequeña blanca
		Boquerón sin cabeza ni cola	6,3 X 10 ³	5	30	bacilos -	Grande amarilla
				6	30	bacilos -	Grande blanca
				7	30	bacilos -	Mediana blanca
				8	30	bacilos -	Mediana blanca
				9	30	bacilos -	Pequeñas transparentes
	SARDINA (<i>Sardina pilchardus</i>)	Mitad con cabeza	4,3 X 10 ⁴	10	30	bacilos +	Grande amarilla
				11	30	bacilos -	Pequeña transparente
				12	30	bacilos -	Pequeña transparente
				13	30	bacilos -	Grande transparente
	JUREL (<i>Trachurus trachurus</i>)	Con cabeza	1,8 X 10 ⁶	14	37	bacilos -	Mediana blanca
				15	30	bacilos -	Mediana amarilla
				16	37	cocos +	Pequeña amarilla
				17	30	bacilos -	Pequeña amarilla
				18	30	bacilos -	Pequeña blanca
	CABALLA (<i>Scomber scombrus</i>) Atlántico Noreste	Ventresca con piel	8,6 X 10 ⁴	19	37	bacilos -	Grande blanca
				20	37	bacilos -	Grande blanca
				21	37	bacilos -	Grande transparente
				22	30	bacilos -	Mediana blanca
				23	30	bacilos -	Pequeña transparente
				24	37	bacilos -	Pequeña blanca
				25	30	bacilos -	Mediana blanca
Acuicultura ENTERO	LENGUADO (<i>Solea spp.</i>)	Lomo con espina, sangre	9,8 X 10 ⁴	26	30	bacilos -	Pequeñas, transparentes
				27	30	bacilos -	Pequeñas, transparentes
				28	30	bacilos -	Pequeñas, transparentes
				29	30	bacilos -	Pequeñas, mucosas
				30	30	bacilos -	Pequeñas, mucosas
	DORADA (<i>Sparus aurata</i>) Santa Pola acuicultura	Lomo con piel	4,5 X 10 ⁵	31	37	bacilos -	Grande blanca
				32	30	bacilos -	Mediana transparente
				33	37	bacilos -	Grande blanca
	LUBINA (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Santa Pola acuicultura	Ventresca con piel	2,8 X 10 ⁶	34	37	bacilos -	Mediana transparente
				35	30	bacilos +	Pequeña transparente
				36	30	bacilos -	Pequeña transparente
	LUBINA (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Santa Pola acuicultura	Lomo con piel	7,6 X 10 ⁵	37	30	bacilos -	Pequeña transparente
				38	37	bacilos -	Pequeña blanca
				39	30	bacilos -	Pequeña blanca
		Ventresca con piel	5,1 X 10 ⁵	40	37	bacilos -	Grande blanca
				41	30	bacilos -	Pequeña blanca

CATEGORÍAS	ALIMENTO	MUESTRA	UFC/g	Nº CEPA	Tª INCUB.	GRAM	MORF. COLONIA
Rodajas y troceado	SALMÓN (<i>Salmo salar</i>) Noruega acuicultura Rodaja envasada poliexpan +film	Externa con piel	7,2 X 10 ⁷	42	37	cocos +	Pequeña amarilla
				43	37	cocos +	Pequeña amarilla
				44	37	cocos +	Pequeña amarilla
				45	37	cocos +	Pequeña amarilla
				46	37	cocos +	Pequeña amarilla
				47	37	cocos +	Pequeña amarilla
		Interno espina	3,0 X 10 ⁷	48	37	cocos +	Pequeña amarilla
				49	37	cocos +	Pequeña amarilla
				50	37	cocos +	Pequeña amarilla
				51	37	cocos +	Pequeña amarilla
				52	37	cocos +	Pequeña amarilla
				53	37	cocos +	Pequeña amarilla
	MERLUZA (<i>Merluccius capensis</i>) Atlántico sudeste (El Cabo, Namibia)	Lomo	7,0 X 10 ⁵	54	37	bacilos +	Transparentes
				55	37	cocos +	Transparentes
	TINTORERA (<i>Prionace glauca</i>) Sin etiqueta	Trozo sin piel	4,2 X 10 ³	56	30	cocos +	Transparentes
				57	37	bacilos -	Transparentes
Moluscos	CALAMAR (<i>Loligo spp.</i>) Atlántico Suroeste Congelado-descongelado	Con tentáculos	2,8 X 10 ⁴	58	30	bacilos -	Transparentes
				59	30	bacilos -	Transparentes
				60	30	bacilos -	Transparentes
				61	30	bacilos -	Transparentes
	MEJILLÓN (<i>Mytilus edulis</i>) Fresco	Contenido interior de la concha	1,5 X 10 ³	62	30	bacilos -	Grande amarilla
				63	37	bacilos -	Grande amarilla
Marisco cocido	LANGOSTINO (<i>Penaeus spp.</i>) Venezuela acuicultura Cocido, descongelado	Entero	4,2 X 10 ⁴	64	30	cocos +	Transparentes
				65	30	cocos +	Transparentes
				66	37	bacilos -	Transparentes
				67	37	cocos +	Transparentes
	CIGALA (<i>Nephrops norvegicus</i>) Cocido descongelado	Mitad posterior (con telsón)	5,1 X 10 ⁵	68	37	bacilos -	Grande blanca
				69	37	bacilos +	Grande blanca
				70	30	bacilos -	Transparentes
		Mitad anterior (con cefalotórax)	3,0 X 10 ⁴	71	30	bacilos -	Transparentes
				72	37	bacilos +	Grande amarilla
				73	37	bacilos -	Mediana blanca

ARTÍCULO 2

**José L. Romero, María J. Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido,
Antonio Gálvez, Rosario Lucas**

**Resistance to antibiotics, biocides, preservatives and metals in bacteria
isolated from seafoods: co-selection of strains resistant or tolerant to
different classes of compounds
Frontiers in Microbiology 8: 1-16**



Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds

José L. Romero, María J. Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido, Antonio Gálvez* and Rosario Lucas

Microbiology Division, Department of Health Sciences, University of Jaen, Jaen, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Avelino Alvarez-Ordóñez,
Universidad de León, Spain

Reviewed by:

Franca Rossi,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale,
Italy

Learn-Han Lee,
Monash University Malaysia, Malaysia

*Correspondence:

Antonio Gálvez
agalvez@ujaen.es

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 21 May 2017

Accepted: 15 August 2017

Published: 31 August 2017

Citation:

Romero JL, Grande Burgos MJ, Pérez-Pulido R, Gálvez A and Lucas R (2017) Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds. *Front. Microbiol.* 8:1650. doi: 10.3389/fmicb.2017.01650

Multi-drug resistant bacteria (particularly those producing extended-spectrum β -lactamases) have become a major health concern. The continued exposure to antibiotics, biocides, chemical preservatives, and metals in different settings such as the food chain or in the environment may result in development of multiple resistance or co-resistance. The aim of the present study was to determine multiple resistances (biocides, antibiotics, chemical preservatives, phenolic compounds, and metals) in bacterial isolates from seafoods. A 75.86% of the 87 isolates studied were resistant to at least one antibiotic or one biocide, and 6.90% were multiply resistant to at least three biocides and at least three antibiotics. Significant ($P < 0.05$) moderate or strong positive correlations were detected between tolerances to biocides, between antibiotics, and between antibiotics with biocides and other antimicrobials. A sub-set of 30 isolates selected according to antimicrobial resistance profile and food type were identified by 16S rDNA sequencing and tested for copper and zinc tolerance. Then, the genetic determinants for biocide and metal tolerance and antibiotic resistance were investigated. The selected isolates were identified as *Pseudomonas* (63.33%), *Acinetobacter* (13.33%), *Aeromonas* (13.33%), *Shewanella*, *Proteus* and *Listeria* (one isolate each). Antibiotic resistance determinants detected included *sul1* (43.33% of tested isolates), *sul2* (6.66%), *bla*_{TEM} (16.66%), *bla*_{CTX-M} (16.66%), *bla*_{PSE} (10.00%), *bla*_{IMP} (3.33%), *bla*_{NDM-1} (3.33%), *floR* (16.66%), *aadA1* (20.0%), and *aac(6')-Ib* (16.66%). The only biocide resistance determinant detected among the selected isolates was *qacE Δ 1* (10.00%). A 23.30 of the selected isolates were able to grow on media containing 32 mM copper sulfate, and 46.60% on 8 mM zinc chloride. The metal resistance genes *pcoA/copA*, *pcoR*, and *chrB* were detected in 36.66, 6.66, and 13.33% of selected isolates, respectively. Twelve isolates tested positive for both metal and antibiotic resistance genes, including one isolate positive for the carbapenemase gene *bla*_{NDM-1} and for *pcoA/copA*. These results suggest that exposure to metals could co-select for antibiotic resistance and also highlight the potential of bacteria on seafoods to be involved in the transmission of antimicrobial resistance genes.

Keywords: antimicrobial resistance, biocides, antibiotics, metals, seafood

INTRODUCTION

The global world fish market reached 175 million tons in 2016 (Food and Agriculture Organization (FAO), 2016). There is a growing concern in the fisheries sector about the increasing prevalence of multidrug-resistant bacterial strains in the food chain (EFSA, 2010; ECDC, 2012, 2013; EFSA-ECDC, 2013; Watts et al., 2017). Multidrug-resistant bacteria carrying extended-spectrum (ESBL) β -lactamase genes can now be found in healthy humans as well as in various animal species, food and even in environmental samples, and have become a threat in hospital settings. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* are particularly of concern because they tend to spread, making infection treatment difficult (Iovleva and Doi, 2017). Resistance genes for antimicrobials such as β -lactams, quinolones, and fluoroquinolones may be associated with plasmids. Plasmids of fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* are widespread, and are often associated with resistance to β -lactams in strains with multidrug resistant phenotypes (Crémet et al., 2011). Some genes, such as the variant *aac(6')-Ib-cr* simultaneously confer resistance to aminoglycosides, and fluoroquinolones (Kim et al., 2011). Others like the efflux pump *oqxAB* described in *Escherichia coli*, confer resistance to various antibiotics and biocides (Hansen et al., 2007; Wong and Chen, 2013).

Different types of selective pressure (such as antibiotics, biocides, or heavy metals) could play a role in the prevalence of antimicrobial resistance in the food chain. Biocides may co-select strains resistant to antibiotics of clinical use, as verified in the case of triclosan, and others (Chuanchuen et al., 2001; Braoudaki and Hilton, 2004; Ortega-Morente et al., 2013). Biocides are widely used in disinfecting equipment and facilities, including fish farming, and fish processing facilities (Directive 98/8/CE). In Gram-negative bacteria, several genes for resistance to biocides belonging to the group of quaternary ammonium compounds (QACs) as *qacE*, *qacE Δ 1*, *qacF*, *qacG*, and *qacH* have been described. Among them, *qacE Δ 1* is the most widespread, as it is found in various groups of Gram-negative bacteria (Kücken et al., 2000). Association of *qacE Δ 1* (and less frequently also *qacH* and *qacF*) with class I integrons together with antibiotic resistance genes has been reported (Mulvey et al., 2006; De Toro et al., 2011). A study of microbial populations in environments contaminated with QACs related the increased incidence of resistance to QACs with a higher incidence of class I integrons (Gaze et al., 2005), suggesting that exposure to QACs could also selected for antibiotic resistance associated with such integrons. Other antimicrobials such as lysozyme-EDTA combinations and chemical preservatives such as sodium lactate and trisodium phosphate also deserve attention because of their wide use and potential applications in the food industry for decontamination and food preservation (Lucera et al., 2012; Bjornsdottir-Butler et al., 2015; Wang et al., 2015). There is also a growing interest in extending the use of plant essential oils or their antimicrobial compounds (such as carvacrol or thymol) for disinfection and food preservation (Lucera et al., 2012; Patel, 2015; Wang et al., 2015). One study showed that exposure to pine oil induced a decreased susceptibility to a range of antimicrobial compounds (including antibiotics and biocides; Moken et al., 1997). Yet,

little is known about development of resistance/tolerance to these compounds, and co-resistance to antibiotics.

Metal salts are used for decontamination in fish farming. Metals such as copper (Cu) and zinc (Zn) are essential micronutrients in living things, but they can become toxic if they are above a certain concentration. Copper and zinc are frequently used in aquaculture and also as antifouling paints on boats (Yebra et al., 2004; Watermann et al., 2005; Guardiola et al., 2012). Copper can be released into the environment by both human activities and natural processes. Zinc is rarely found in nature in its metallic state, but many minerals contain zinc as a main component. The main anthropogenic sources of zinc are mining, zinc production facilities, iron, and steel production, corrosion of galvanized structures, coal, and fuel combustion, waste disposal and incineration, and the use of fertilizers, and pesticides containing zinc (WHO, 2001). Fish can accumulate and transmit heavy metals along the food chain. The genes that control resistance to metals may be associated with plasmids, which provide bacteria a competitive advantage over other organisms when specific metals are present (Trevors et al., 1985; Hobman and Crossman, 2014). The appearance of multidrug resistance plasmids carrying resistance to heavy metals is alarming and requires additional monitoring (Gómez-Sanz et al., 2013). The co-location of metal-resistance and antimicrobial-resistance genes can facilitate their persistence, co-selection, and dissemination (Gómez-Sanz et al., 2013; Wales and Davies, 2015).

The aim of this study was to provide insights on resistance to clinically relevant antibiotics in bacterial strains isolated from seafood sold at supermarkets and fishmarket. Since exposure to other types of antimicrobials such as biocides and metals could co-select for antibiotic resistance, we hypothesized that antibiotic-resistant strains from seafoods could also be phenotypically resistant, and/or carry genetic determinants of resistance to other antimicrobials, thus increasing the risk of transmission of antibiotic resistance through the seafood production chain. Therefore, susceptibility of bacterial strains isolated from different seafood samples against various biocides, antibiotics, and metals was evaluated, and the presence of resistance genes in multiresistant strains was determined. A special emphasis was made on extended-spectrum β -lactamase genes because of the risks that ESBL-producing bacteria may pose to human health.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolation

A total of 22 seafood samples from 16 different fish and seafood species purchased at supermarkets and fishmarket in the province of Jaen (Spain) during the years 2013 and 2014 were investigated (Table 1). Unless indicated, samples consisted of unprocessed whole specimens from sea fishing, and were sold over the counter on ice. Samples (25 g each) were suspended in 225 ml of buffered peptone water supplemented with 10 g of NaCl/liter and homogenized by stomaching with as Stomacher 400 (Sewald, UK). The samples were analyzed following standard

TABLE 1 | Sensitivity to antibiotics, biocides and other antimicrobials in bacterial isolates recovered from seafoods.

Food source and isolate	Viable counts (Log ₁₀ CFU/g)	RESISTANCE PHENOTYPE	BC	CT	HDP	TC	CF	CHX	PHMG	OX	CVC	THY	SL	TSP	L	LE
Anchovy (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	4.27; 3.80; 4.32															
B2		AMP, CTX, CM, NA, TM/STX, TC	25	7.5	25	>250	25	5	25	25	0.050	0.250	5.00	1.00	>0.01	ABC
B6			25	2.5	25	25	5	20	2.5	7.5	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
B7		AMP, CM, NA, TM/STX	25	7.5	50	5	25	5	5	2.5	0.050	0.250	5.00	0.75	>0.01	ABC
B22			25	2.5	25	25	25	15	5	25	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
B24			25	2.5	25	25	25	20	5	10	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
4B1		AMP, NA, TM/STX	25	2.5	25	5	25	10	25	25	0.100	0.010	5.00	0.75	>0.01	ABC
4B21		AMP, TM/STX	25	2.5	25	5	25	10	25	25	0.100	0.050	5.00	0.75	>0.01	ABC
4B22		NA, CHX	25	0.5	25	25	5	50	7.5	10	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
4B23		AMP, NA, CHX	25	2.5	25	25	25	50	7.5	10	0.100	0.125	5.00	0.75	>0.01	ABC
4B31		AMP, CTX, IMP, CM, TM/STX, BC, CT, HDP, PHMG, TC	250	25	>250	>250	25	20	100	25	1.00	0.125	5.00	1.00	>0.01	ABC
4B41		NA	25	0.5	25	5	5	1	5	25	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
4B43		AMP, CTX, CM, NA, TM/STX	25	2.5	50	5	25	10	25	25	1.000	0.125	5.00	0.75	>0.01	ABC
Sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	4.63; 4.50															
4Sd1		AMP, NA, TM/STX, CHX, OX	25	5	25	50	25	50	25	>250	0.100	0.050	5.00	1.00	>0.01	ABC
4Sd3		BC	250	2.5	25	5	5	5	2.5	7.5	0.100	0.010	3.00	0.50	>0.01	ABC
4Sd21		CHX, PHMG, OX	25	5	25	50	25	50	100	>250	0.050	0.010	5.00	1.50	>0.01	C
4Sd22		TM/STX, TC	50	7.5	25	>250	25	15	25	75	0.100	0.050	5.00	0.75	>0.01	ABC
4Sd41		AMP, CTX, CM, S, CHX, PHMG, TC	50	7.5	25	>250	25	50	100	250	0.100	0.250	5.00	0.75	>0.01	ABC
4Sd42		AMP, NA, TM/STX	25	2.5	25	5	25	5	25	100	0.050	0.125	5.00	0.50	>0.01	ABC
4Sd51		AMP, S	50	0.5	25	50	25	10	5	250	0.050	0.010	5.00	1.50	>0.01	ABC
4Sd52		AMP	50	2.5	25	50	25	20	7.5	250	0.025	0.010	5.00	0.75	>0.01	ABC
4Sd53		AMP, CHX	25	2.5	25	25	25	50	25	250	0.100	0.250	3.00	1.00	>0.01	ABC
4Sd54			50	0.5	25	5	5	1	5	100	0.025	0.010	1.00	0.25	>0.01	ABC
Blue whiting (<i>Micromesistius poutassou</i>)	3.78															
4Ba1		AMP, TM/STX	25	2.5	25	5	25	10	7.5	250	0.050	0.250	3.00	0.50	>0.01	ABC
4Ba2			5	0.5	5	5	5	1	0.5	5	0.025	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
4Ba31		AMP, TM/STX	5	0.5	5	5	5	1	5	50	0.010	0.010	1.00	0.25	>0.01	ABC
4Ba32			5	0.5	5	5	5	1	0.5	5	0.010	0.010	1.00	0.25	>0.01	ABC
4Ba33		IMP	25	2.5	5	25	25	15	7.5	250	0.010	0.250	3.00	0.50	>0.01	ABC

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Food source and isolate	Viable counts (Log ₁₀ CFU/g)	RESISTANCE PHENOTYPE	BC	CT	HDP	TC	CF	CHX	PHMG	OX	CVC	THY	SL	TSP	L	LE
4Ba41	6.25		25	2.5	25	25	25	15	5	50	0.025	0.250	5.00	0.75	>0.01	ABC
4Ba42		AMP, TM/STX	25	2.5	25	5	25	10	7.5	50	0.025	0.010	3.00	0.50	>0.01	ABC
Athlantic horse mackerel (<i>Trachurus trachurus</i>)																
J2		AMP, CTX, CM, S, NA, TM/STX, CT, HDP, TC	5	25	>250	250	25	10	0.5	5	0.100	0.250	5.00	1.00	>0.01	ABC
J4		AMP, CTX, CM, TM/STX, BC, CT, HDP, TC	>250	25	>250	250	25	10	25	100	0.100	0.250	3.00	1.00	>0.01	ABC
J5	4.93	NA	5	0.5	5	5	5	1	0.5	0.5	0.025	0.250	5.00	1.50	>0.01	ABC
J6		CM	25	2.5	50	25	25	5	5	25	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
J7		AMP, S, BC	250	7.5	50	25	25	5	2.5	75	0.100	0.125	3.00	0.75	>0.01	ABC
Mackerel (<i>Scomber scombrus</i>)																
Cb22		AMP, IMP, CHX	25	0.5	25	50	25	50	10	250	0.025	0.250	5.00	3.00	>0.01	ABC
Cb27		AMP, CTX, IMP, CM, NA, TM/STX, TC	50	7.5	25	250	25	10	25	250	0.050	0.250	5.00	1.50	>0.01	ABC
Cb212		AMP, CTX, CM, NA, TM/STX, TC	50	7.5	25	>250	25	10	25	250	0.100	0.250	5.00	1.50	>0.01	ABC
Sole (<i>Solea</i> spp.)	4.99; 5.62															
Le1	5.84	AMP	5	2.5	25	25	25	20	0.5	5	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
Le2			25	2.5	50	50	25	15	5	75	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
Le4		AMP	25	2.5	50	50	25	15	5	75	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
Le5		CHX	25	2.5	50	50	25	50	5	50	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
Hake (<i>Merluccius capensis</i> ; sliced)	5.84															
M135	3.62	CHX	5	0.5	25	5	5	50	0.5	5	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
Blue shark (<i>Prionace glauca</i> ; sliced)																
T213			25	2.5	25	5	25	5	2.5	50	0.025	0.010	3.00	1.00	0.0025	ABC
T215		S, CHX	50	7.5	50	50	25	50	25	250	0.025	0.010	5.00	1.50	>0.01	ABC
Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	6.44															
Do11		AMP, IMP, CHX	25	2.5	25	25	25	50	7.5	250	0.025	0.250	3.00	3.00	>0.01	ABC
Do15			25	2.5	50	50	25	20	10	250	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
Do24		AMP, IMP, CHX	25	2.5	25	50	25	50	5	100	0.025	0.010	5.00	3.00	>0.01	ABC
Do26		S, CHX	25	2.5	50	50	25	50	25	75	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Food source and isolate	Viable counts (Log ₁₀ CFU/g)	RESISTANCE PHENOTYPE	BC	CT	HDP	TC	CF	CHX	PHMG	OX	CVC	THY	SL	TSP	L	LE
Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> ; aquaculture)	5.88; 5.70															
Lbi14		CHX	25	2.5	50	50	25	50	25	50	0.010	0.010	3.00	0.75	>0.01	ABC
Lbi15		AMP, CTX, IMP, CM, NA, TM/STX, TC	50	7.5	50	>250	25	20	25	100	0.100	0.250	5.00	1.50	>0.01	ABC
Lbi16		AMP, CTX, CAZ, IMP, CM, S, NET, CIP, NA, TM/STX, PHMG, TC, OX	75	5	50	250	25	10	100	>250	0.100	0.250	3.00	1.00	>0.01	ABC
Lbi25		AMP, CTX, IMP, CM, S, NA, TM/STX, BC, CT, HDP, PHMG, TC, OX	>250	25	250	250	25	10	100	>250	0.100	0.250	3.00	0.25	>0.01	ABC
Salmon (<i>Salmo salar</i> ; slices packed in trays; aquaculture)	7.85; 7.47															
S11		AMP, CTX, CAZ, CM, NA	25	2.5	25	5	25	10	25	250	0.010	0.025	5.00	1.00	0.0025	ABC
S12		AMP, CTX, CM, S	25	2.5	25	5	25	10	25	250	0.010	0.010	3.00	1.00	0.0025	ABC
S13		AMP, CAZ, CM	25	2.5	25	5	25	20	25	250	0.010	0.010	3.00	0.75	0.0025	ABC
S14		AMP, CAZ, CM, S, NA	25	2.5	25	5	25	20	25	250	0.010	0.025	3.00	1.00	0.0025	ABC
S15		AMP, CTX, CM, NA	25	2.5	25	5	25	20	25	250	0.010	0.025	3.00	1.00	0.0025	ABC
S16		AMP, CTX, CM, TE	25	2.5	25	5	25	15	25	250	0.010	0.025	3.00	1.00	0.0025	ABC
S21		AMP, CM, NA	25	2.5	25	5	25	10	25	250	0.010	0.025	3.00	1.00	0.0025	ABC
S22		AMP, CTX, CM, S, NA	25	2.5	25	5	25	20	25	250	0.010	0.025	3.00	1.00	0.0025	ABC
S23		AMP, CTX, CM, NA	25	2.5	25	5	25	10	25	250	0.010	0.025	5.00	1.50	0.0025	ABC
S24		AMP, CTX, CM, NA	25	2.5	25	5	25	10	25	250	0.010	0.025	5.00	1.50	0.0025	ABC
S25		AMP, CTX, CM, S, NA	25	2.5	25	5	25	10	25	250	0.010	0.025	3.00	1.50	0.0025	ABC
S26		AMP, CM, NA	25	2.5	25	5	25	10	25	250	0.010	0.025	3.00	1.50	0.0025	ABC
Squid (<i>Loligo</i> spp.)	4.44															
C121			25	2.5	25	25	25	5	5	25	0.025	0.010	3.00	1.50	>0.01	ABC
C123			25	2.5	25	25	25	5	2.5	25	0.025	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
C125			25	2.5	25	25	25	5	2.5	25	0.025	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
C126			25	2.5	25	25	25	5	5	25	0.025	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Food source and isolate	Viable counts (Log ₁₀ CFU/g)	RESISTANCE PHENOTYPE	BC	CT	HDP	TC	CF	CHX	PHMG	OX	CVC	THY	SL	TSP	L	LE
Juvenile squid (<i>Loligo vulgaris</i>)	4.49															
4C1		CAZ, S, NA	25	0.5	25	25	5	5	5	250	0.025	0.010	1.00	0.75	>0.01	ABC
4C4		AMP, TM/STX	25	2.5	5	5	5	1	0.5	5	0.025	0.010	1.00	0.25	>0.01	ABC
4C21		CTX, CAZ, S, NA	25	2.5	25	25	5	5	5	250	0.025	0.010	1.00	0.75	>0.01	ABC
4C22		AMP, TM/STX	25	5	25	5	25	10	7.5	75	0.100	0.250	3.00	0.50	>0.01	ABC
4C23		CTX, CAZ, S, NA	25	2.5	25	5	5	5	5	100	0.025	0.010	1.00	0.75	>0.01	ABC
4C31			25	2.5	25	25	25	15	7.5	250	0.025	0.250	3.00	0.50	>0.01	ABC
4C32		AMP, CTX, IMP, CM, NA, BC, CT, HDP, CHX, PHMG, TC	>250	25	>250	>250	25	50	100	250	0.100	0.125	5.00	1.00	>0.01	ABC
4C51		CAZ, S	5	0.5	5	5	5	1	5	5	0.010	0.010	1.00	0.25	>0.01	ABC
4C52		AMP, CTX, C, NA, TM/STX, HDP, TC	75	10	250	>250	25	15	25	250	0.100	0.010	5.00	0.75	>0.01	ABC
Mussels (<i>Mytilus edulis</i>)	3.65															
Mj2		AMP, IMP, S, CHX	25	5	25	50	25	50	7.5	250	0.025	0.250	5.00	3.00	>0.01	ABC
Prawns (<i>Penaeus</i> spp.; boiled and frozen; aquaculture)	4.60															
L122		AMP, CAZ	25	2.5	25	25	25	5	5	50	0.025	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
L123		AMP, CTX, CAZ, IMP, CM, S, NET, TE, CIP, TM/STX	25	2.5	25	5	25	5	0.5	50	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
L124		AMP, IMP, CHX	25	5	25	50	25	50	10	250	0.025	0.250	5.00	3.00	>0.01	ABC
L125			25	2.5	25	5	5	5	2.5	250	0.010	0.250	3.00	1.00	>0.01	ABC
Norway lobster (<i>Nephrops norvegicus</i> ; boiled and frozen)	4.47															
Cg11			25	2.5	25	5	5	5	2.5	250	0.010	0.010	3.00	3.00	>0.01	ABC
Cg12			5	2.5	25	5	5	5	0.5	5	0.010	0.010	3.00	1.50	>0.01	ABC
Cg14			25	2.5	25	5	25	5	2.5	25	0.010	0.010	3.00	1.00	>0.01	ABC
Cg21			25	2.5	25	5	5	5	2.5	250	0.025	0.010	3.00	3.00	>0.01	ABC
Cg22		AMP, CM, NA, TM/STX, TC	25	5	25	250	25	5	25	250	0.050	0.250	5.00	1.50	>0.01	ABC

In bold, isolates selected for further study.

AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; IMP, imipenem; CIP, ciprofloxacin; NA, nalidixic acid; CM, chloramphenicol; S, streptomycin; NET, netilmicin; TE, tetracycline; TM/STX, trimethoprim/sulfamethoxazole. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for biocides (in mg/l, or in microliters of commercial solution per liter in the case of OX), phenolic compounds and preservatives (in %) are indicated. BC, benzalkonium chloride; CT, cetrimide; CHX, chlorhexidine; HDP, hexadecylpyridinium chloride; TC, triclosan; PHMG, polyhexamethylen guanidium chloride; OX, P3 Oxonia (in microliters of commercial solution per; CVC, carvacrol; THY, thymol (THY); SL, sodium lactate; TSP, trisodium phosphate; L, lysozyme (L). LE, lysozyme-EDTA combinations (A, B, C indicate the different LE inhibitory combinations).

procedures for microbiological analysis of food by plating serial dilutions on Trypticase Soya Agar (TSA, Scharlab, Barcelona, Spain) supplemented with 10 g of NaCl/liter (saline TSA, STSA). After 24–48 h incubation at 30°C, colonies were purified by streaking on TSA (without added NaCl), and the pure cultures were examined by Gram-staining, catalase and oxidase tests, and stored at –80°C in Trypticase Soya Broth (TSB, Scharlab) supplemented with 20% glycerol.

Determination of Resistance to Antibiotics, Biocides, and Other Antimicrobial Compounds

A collection of 87 bacteria randomly isolated from the different seafood samples were screened for sensitivity to biocides, antibiotics, and other antimicrobial compounds as described below. Benzalkonium chloride (BC), cetrimide (CT), hexadecylpyridinium chloride (HDP), chlorhexidine digluconate (CHX), triclosan (TC), and hexachlorophene (CF) were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The commercial solution of benzalkonium chloride contained 50% (wt/v) of the active compound. Triclosan and hexachlorophene were dissolved (10% wt/v) in 96% ethanol. HDP (5% wt/v), CT (10% wt/v), and CHX (20% wt/v) were dissolved aseptically in sterile distilled water. Poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride (PHMG) solution (containing 7.8% of PHMG, by weight) was a kind gift of Oy Soft Protector Ltd (Espoo, Finland). P3 oxonia (OX, containing 25–35% hydrogen peroxide, 0.83–2.5 N acetic acid, and 0.26–0.66 N peracetic acid) was supplied by ECOLAB (Barcelona, Spain). Biocide solutions were stored at 4°C for ≤7 days. Carvacrol (CVC), thymol (THY), sodium lactate (SL), trisodium phosphate (TSP), lysozyme (L), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were from Sigma-Aldrich. Solutions containing 100 mg/l lysozyme and 5 mM EDTA were combined in different proportions to yield the following final concentrations: A, 30 mg/l lysozyme plus 3.5 mM EDTA; B, 50 mg/l lysozyme plus 2.5 mM EDTA; C, 70 mg/l lysozyme plus 1.5 mM EDTA. Minimum inhibitory concentrations (MIC's) were determined by the broth microdilution method on 96-well, flat-bottom microtiter plates (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Briefly, serial dilutions of each antimicrobial were inoculated (1%, vol/vol) with overnight cultures of bacterial strains grown in Trypticase Soya Broth (TSB; Scharlab). Growth and sterility controls were included for each isolate. Microtiter plates were incubated at 30°C. Optical density (OD 595 nm) readings were performed with an iMark Microplate Reader (BioRad, Madrid) after 24–48 h incubation. All assays were done in triplicate.

Antibiotic resistance was determined by the disk diffusion method as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2015) on cation-adjusted Mueller-Hinton agar (Fluka, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Disks containing ampicillin (AMP, 10 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), imipenem (IMP, 10 µg), streptomycin (S, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), and trimethoprim/sulfamethoxazole (TM/STX,

1.25/23.75 µg) were supplied by Biomérieux (Madrid, Spain). Chloramphenicol (CM, 30 µg) was from BBL (Madrid, Spain).

Identification of Antimicrobial-Tolerant Isolates

From the preliminary screening on antimicrobial resistance, 30 isolates were selected for further study based on food source, antibiotic resistance and biocide tolerance. Selected isolates were resistant to at least three antibiotics or at least to one antibiotic and one biocide. The 30 isolates were identified by 16S rDNA sequencing. DNA was extracted with a bacterial genomic DNA extraction kit (GenElute™, Sigma-Aldrich) and 16 S rDNA was amplified as described by Abriouel et al. (2005). PCR amplification products were purified using a GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE-Healthcare, Spain), and then sequenced according to Weisburg et al. (1991) in a CEQ 2000 XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, CA, USA). The DNA sequences obtained were searched for homology by using the BLAST algorithm available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA).

Determination of Tolerance to Metals

The selected 30 isolates were tested for tolerance to copper and zinc metals as follows. Mueller-Hinton II agar plates (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) were supplemented with CuSO₄•5H₂O (PanReac, Barcelona, Spain) (4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, and 36 mM, adjusted to pH 7.2) or ZnCl₂ (PanReac) (2, 4, 8, and 16 mM, adjusted to pH 6.5) according to Cavaco et al. (2011). Then, plates were inoculated with 2 µl from overnight cultures of bacterial strains diluted 10-folds in sterile saline solution. The plates were incubated at 37°C under aerobic conditions and inspected for bacterial growth after 24 h. The lowest metal concentration that inhibited growth of the inoculated bacterial strains was taken as the MIC.

Investigation of Genetic Determinants of Resistance

The selected 30 isolates were investigated for the presence of genetic determinants of resistance. The presence of the biocide resistance genes *qacE* and *qacEΔ1* and their possible association with class I integrons was investigated by PCR according to Chuanchuen et al. (2007). Specifically, the forward primer *qacEF* was used in combination with reverse primers *qacER* and *suIR* for amplification of *qacE*, *qacEΔ1* and the 3' coding sequence (3' CS).

The following extended-spectrum β-lactamase genetic determinants were investigated by PCR: *bla*_{TEM} (Sáenz et al., 2004), *bla*_{PSE} (Chiu et al., 2006), *bla*_{CTX-M}, and *bla*_{CTX-M-2} (Bertrand et al., 2006), as well as carbapenemases *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-23}, and *bla*_{VIM-2} (Ramakrishnan et al., 2014). Other antimicrobial resistance genes investigated by PCR were the aminoglycoside resistance genes *aadA1* (Guerra et al., 2001), and *aac(6')-Ib* (Park et al., 2006), the phenicol resistance genes *floR* (Chiu et al., 2006) and *cmlA* (Sáenz et al., 2004), and the sulfonamide and trimethoprim resistance genes *sul1* (Guerra et al., 2001), *sul2* (Sáenz et al., 2004), and *sul3* (Sáenz et al., 2010).

The gene for the multicopper oxidase found in the plasmid-borne operons *pcoABCDRE* (described in *Pseudomonas syringae*) and *copABCDRS* (*E. coli*) was investigated using the primers and PCR conditions described for *pcoA/copA* by Badar et al. (2014). The additional genes *copB*, *copC*, *copD* (Kamika and Momba, 2013; Badar et al., 2014) and *pcoR* (Brown et al., 1992) were also investigated. The chromosomal *cueAR* operon, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida* was investigated according to Adaikkalam and Swarup (2002). The *czcD* gene involved in the regulation of the CZC zinc, cobalt, and cadmium efflux system was investigated by PCR according to Medardus et al. (2014). The chromate resistance gene *chrB* was investigated as described by Chihomvu et al. (2015) and Nies et al. (1990).

Statistical Analysis

The relationships between resistances to the different antimicrobials tested were studied by Principal component analysis with Pearson correlation coefficient (*r*) by using IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) and Mstat statistics and graphics package (Systat Software, Hounslow, London, UK; evaluation version 2015.1). Positive correlations were defined as very weak (0.00–0.19), weak (0.20–0.39), moderate (0.4–0.59), strong (0.60–0.79) or very strong (0.80–0.99), with a *P* significance of <0.05.

RESULTS

Microbial Load and Bacterial Isolation

The microbial load (aerobic mesophiles) of the different seafood samples is shown in **Table 1**. Most samples had viable cell counts comprised between 4 and 7 log CFU/g. Lowest viable counts were reported for blue shark, and highest counts were found in refrigerated raw salmon slices packed in trays.

After viable cell counting, bacterial colonies grown on saline TSA from highest dilutions were repurified by streaking on TSA without added salt. This was done so in order to avoid possible interference of added salt in growth media with antimicrobial resistance tests. A total of 87 bacterial colonies isolated at random were selected, representing the different seafood products sampled (**Table 1**). Eighty two of them were Gram-negatives (including mainly bacilli), while the remaining five were Gram-positive (including four cocci and one rod).

Antimicrobial Resistance

The 87 isolates were tested for sensitivity to antibiotics, biocides and other antimicrobials (carvacrol, thymol, sodium lactate, trisodium phosphate, lysozyme, and different lysozyme-EDTA combinations; **Table 1**). The incidence of resistance to β -lactam antibiotics was highest for AMP (57.47% of isolates), followed by CTX (27.59%), IMP (14.94%), and CAZ (11.49%). Resistance to protein synthesis inhibitors was detected mostly for CM (33.33%) and S (20.69%), while resistance to TE (2.30%) and NET (2.30%) was low. Remarkably, a 35.63% of isolates were resistant to NA, but only 2.30% were resistant to CIP. A 27.58% of isolates were resistant to TM/STX. A 39.08% of isolates were resistant to three

or more antibiotics, and 18.40% were resistant to five or more. Two isolates were resistant to 10 out of the 11 antibiotics tested.

Bacterial isolates were tested for biocide tolerance in two groups (Gram-positives, and Gram-negatives) since Gram-negative bacteria in general have greater tolerance to biocides because of the outer membrane permeability barrier. Only low percentages of the Gram negative isolates showed high tolerance levels to the biocides BC (5.75%; MIC $\geq$ 250 mg/l), CT (5.75%; MIC $\geq$ 25 mg/l), HDP (6.90%; MIC $\geq$ 250 mg/l), PHMG (6.90%; MIC $\geq$ 100 mg/l), and OX (4.60%; MIC > 250 μ l/l) (**Table 1**). Higher percentages of biocide-tolerant isolates were obtained for CHX (19.54%; MIC $\geq$ 50 mg/l) and TC (16.09%; MIC $\geq$ 250 mg/l). Among the Gram positive isolates, only one had a high MIC of 250 mg/l for BC. A total of seven isolates showed high tolerance to three or more biocides (**Table 1**).

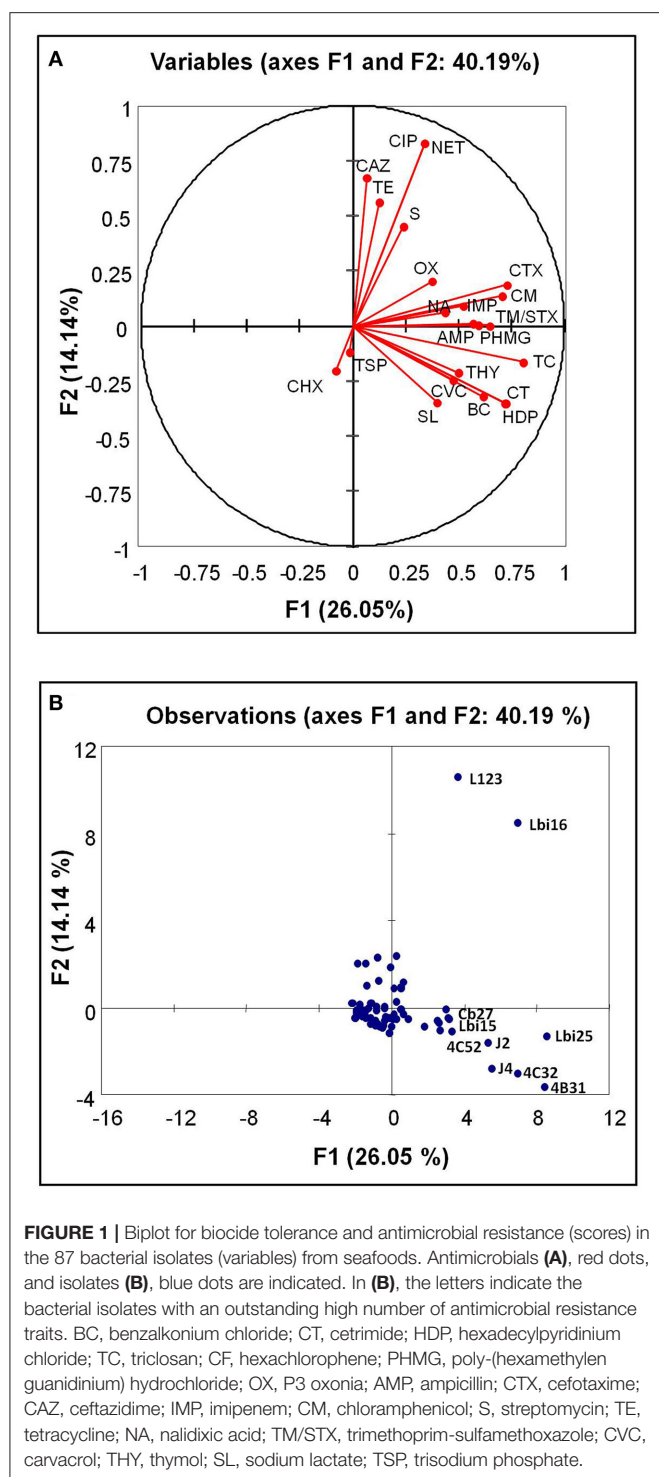
Isolates showed large differences in sensitivities to carvacrol and thymol (**Table 1**). Only two isolates had MICs higher than 0.25% for carvacrol, and 16.39% of isolates required 0.1% for inhibition. By contrast, 43.68% of isolates were inhibited by very low carvacrol concentration (0.01%). Regarding thymol, 26.44% of isolates had a MIC of 0.25%, but none required concentrations higher than this value for inhibition. There was also a high percentage of isolates (55.17%) that were inhibited by a low concentration of thymol (0.025%).

Most isolates were inhibited by sodium lactate at 3% (55.17%) or 5% (35.63%), while the rest (9.20%) were inhibited at 1% (**Table 1**). However, isolates were more heterogeneous in sensitivity to trisodium phosphate (TSP). About 80% of isolates were inhibited at TSP concentrations in the range of 0.75–1.5%, and only a small percentage (8.04%) required a TSP concentration of 3% for inhibition.

Most isolates (85.06%) were resistant to the highest concentration of lysozyme tested (100 mg/l), and only a low percentage (14.94%) were inhibited by a low lysozyme concentration (2.5 mg/l; **Table 1**). When lysozyme was tested in combination with EDTA at different proportions, all combinations were effective against most isolates, except for one isolate that only was inhibited by lysozyme-EDTA combination C containing a higher proportion of lysozyme to EDTA.

Correlations between Antimicrobial Resistances

Of the 87 isolates, 66 (75.86%) were resistant to antibiotics and/or tolerant to biocides. Comparing biocides and antibiotics, of the 29 isolates tolerant to at least one biocide (33.33%), 27 (31.03%) were also resistant to at least one antibiotic (**Table 1**). Six isolates (6.90%) were tolerant to at least three biocides and at least three antibiotics. The correlations between the different antimicrobials tested for the 87 bacterial isolates are shown in **Figure 1** and **Table 2**. Only the statistically significant (*P* < 0.05) positive correlations that were moderate, strong or very strong are described below. The statistically significant (*P* < 0.05) weak correlations are also listed in **Table 2**, but are not described in the text.



The following pairs of biocides showed positive correlations that were very strong (CT-HDP), strong (BC-CT, BC-HDP, and HDP-TC) or moderate (BC-TC, BC-PHMG, CT-TC, CT-PHMG, HDP-PHMG, TC-PHMG, and PHMG-OX).

For antibiotics, the following positive correlations were very strong (CIP-NET), strong (CTX-CM) or moderate (AMP-CTX,

AMP-CM, AMP-TM/STX, CTX-NA, CAZ-CIP, CAZ-SM, CAZ-NET, CIP-TE, NA-CM, and TE-NET).

For the rest of antimicrobials tested (CVC, THY, SL, TSP), the only significant ($P < 0.05$) correlations detected were weak (Table 2).

Interestingly, significant ($P < 0.05$) positive correlations were also detected between antimicrobials belonging to the different groups tested. For example, moderate positive correlations were detected for the biocides CT, HDP, and TC with the antibiotic CTX, and also for TC with CM and TM/STX and with the phenolic compound THY (Table 2). A few antibiotics showed moderate positive correlations with the rest of antimicrobials tested, as in the case of AMP with SL and IMP with THY and TSP.

From the preliminary general study, 30 isolates were selected for further analysis regarding metal resistance, identification, and study of the genetic determinants of resistance.

Identification of Selected Isolates

The 30 isolates selected for further study were identified by 16s rDNA sequencing (Table 3). Most of them (96.66%) were identified as Gram negative bacteria: *Pseudomonas brassicacearum* (10.00%), *Pseudomonas poae* (16.67%), *P. putida* (3.33%), *Pseudomonas synxantha* (26.67%), *Pseudomonas* spp. (6.67%), *Acinetobacter calcoaceticus* (10.00%), *Acinetobacter oleivorans* (3.33%), *Aeromonas salmonicida* (10.00%), *Aeromonas* spp. (3.33%), *Shewanella baltica* (3.33%), and *Proteus mirabilis* (3.33%). The only Gram positive isolate identified belonged to *Listeria innocua* (3.33%).

Genetic Determinants of Biocide Tolerance and Antibiotic Resistance

Results obtained on the genetic determinants of resistance for the selected isolates are shown in Table 3. Twenty seven out of the 30 isolates tested positive for at least one of the genetic determinants studied. The only QAC resistance determinant detected was *qacEΔ1*. It was found in three isolates of *A. calcoaceticus* from salmon and in one *Proteus mirabilis* isolate from blue shark. The genetic determinant for sulfonamide resistance *sul1* was detected in 13 isolates, two of which also tested positive for *sul2*. In addition, three *A. calcoaceticus* isolates positive for *sul1* also were positive for *qacEΔ1*. However, PCR experiments using a *qacEF* primer and a *sulR* primer did not yield any amplification, suggesting that both genetic determinants were not physically close as in class I integrons.

Among the β -lactamase genes tested, *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M}* were the most frequent. Of the five isolates positive for *bla_{TEM}*, three belonged to genus *Acinetobacter* isolated from salmon, one to *Aeromonas* and one to *Pseudomonas*. Five isolates tested positive for *bla_{CTX-M}*: *Pseudomonas* (3), *Acinetobacter* and *Proteus*. The genetic determinant *bla_{PSE}* was detected in three isolates, including two *Pseudomonas* and the *L. innocua* isolate obtained from squid. Furthermore, *bla_{IMP}* and *bla_{NDM-1}* were detected in one *Pseudomonas* isolate each, both from anchovies. The remaining β -lactamase genes investigated were not detected.

The phenicol resistance determinant *floR* was detected in five isolates (all of them belonging to genus *Pseudomonas*)

TABLE 2 | Correlations between antibiotic resistance and tolerance to biocides and other antimicrobials in the 87 bacterial isolates recovered from seafood.

Variables	BC	CT	CHX	HDP	TC	PHMG	OX	AMP	CTX	CAZ	IMP	CIP	NA	CM	S	NET	TE	TM/STX	CVC	THY	SL	TSP
BC	1.000																					
CT	0.788	1.000																				
CHX	0.003	0.003	1.000																			
HDP	0.712	0.907	-0.020	1.000																		
TC	0.429	0.564	-0.137	0.621	1.000																	
PHMG	0.517	0.517	0.095	0.463	0.498	1.000																
OX	0.182	0.182	0.169	0.157	0.203	0.590	1.000															
AMP	0.212	0.212	-0.045	0.234	0.313	0.142	0.078	1.000														
CTX	0.290	0.400	-0.239	0.441	0.570	0.339	0.110	0.427	1.000													
CAZ	-0.089	-0.089	-0.178	-0.098	-0.060	0.044	0.093	0.018	0.181	1.000												
IMP	0.312	0.312	0.363	0.268	0.343	0.395	0.216	0.295	0.246	0.051	1.000											
CIP	-0.038	-0.038	-0.076	-0.042	0.142	0.261	0.333	0.132	0.249	0.426	0.366	1.000										
NA	0.023	0.126	-0.125	0.176	0.327	0.082	0.180	0.349	0.507	0.183	0.025	0.046	1.000									
CM	0.244	0.349	-0.287	0.385	0.553	0.289	0.078	0.559	0.764	0.127	0.182	0.217	0.543	1.000								
S	0.118	0.118	-0.037	0.085	0.085	0.197	0.159	0.095	0.320	0.439	0.104	0.300	0.153	0.181	1.000							
NET	-0.038	-0.038	-0.076	-0.042	0.142	0.261	0.333	0.132	0.249	0.426	0.366	1.000	0.046	0.217	0.300	1.000						
TE	-0.038	-0.038	-0.076	-0.042	-0.067	-0.042	-0.034	0.132	0.249	0.185	0.151	0.488	-0.114	0.217	0.111	0.488	1.000					
TM/STX	0.179	0.290	-0.239	0.339	0.570	0.136	0.233	0.479	0.310	-0.061	0.174	0.249	0.293	0.327	-0.061	0.249	0.077	1.000				
CVC	0.368	0.368	-0.068	0.350	0.279	0.335	0.042	0.216	0.298	-0.083	0.179	-0.004	0.101	0.250	-0.061	-0.004	-0.051	0.373	1.000			
THY	0.216	0.276	0.125	0.221	0.493	0.221	0.118	0.341	0.205	-0.166	0.444	0.068	0.169	0.230	0.005	0.068	-0.099	0.388	0.167	1.000		
SL	0.054	0.135	0.212	0.178	0.371	0.178	0.084	0.408	0.195	-0.331	0.239	-0.066	0.265	0.291	-0.173	-0.066	-0.066	0.278	0.273	0.388	1.000	
TSP	-0.107	-0.088	0.368	-0.104	-0.032	-0.069	-0.049	0.109	-0.039	-0.142	0.426	-0.019	-0.049	-0.015	-0.032	-0.019	-0.019	-0.225	-0.077	0.171	0.358	1.000

BC, benzalkonium chloride; CT, cetrimer; CHX, chlorhexidine; HDP, hexadecylpyridinium chloride; TC, triclosan; PHMG, polyhexamethylen guanidium chloride; OX, P3 Oxonia; AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; IMP, imipenem; CIP, ciprofloxacin; NA, nalidixic acid; CM, chloramphenicol; S, streptomycin; NET, netilmicin; TE, tetracyclin; TM/STX, trimethoprim/sulfamethoxazole; CVC, cavacarol; THY, thymol; SL, sodium lactate; TSP, trisodium phosphate. Data in bold indicate significant correlations at $P < 0.05$ level.

TABLE 3 | Characterization of selected isolates.

Isolate	Food source	Genetics determinants of resistance	CuSO ₄ (MIC)	ZnCl ₂ (MIC)
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 4Sd1	Sardine	<i>sul1</i> , <i>chrB</i>	16	4
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 4B1	Anchovy	<i>chrB</i>	16	4
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 4B43	Anchovy		16	4
<i>Pseudomonas poae</i> B2	Anchovy	<i>sul1</i> , <i>floR</i>	20	16
<i>Pseudomonas poae</i> J7	Athlantic horse mackerel	<i>floR</i> , <i>pcoR</i> , <i>chrB</i>	32	8
<i>Pseudomonas poae</i> 4Sd41	Sardine		36	16
<i>Pseudomonas poae</i> 4Sd42	Sardine	<i>bla</i> _{PSE} , <i>aadA1</i> , <i>pcoR</i> , <i>chrB</i>	12	4
<i>Pseudomonas poae</i> 4C52	Squid	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>aadA1</i> , <i>pcoA/copA</i>	32	4
<i>Pseudomonas putida</i> Cg22	Norway lobster	<i>bla</i> _{TEM} , <i>pcoA/copA</i>	32	16
<i>Pseudomonas synxantha</i> J2	Athlantic horse mackerel	<i>sul1</i> , <i>bla</i> _{CTX-M}	36	16
<i>Pseudomonas synxantha</i> J4	Athlantic horse mackerel	<i>sul1</i> , <i>floR</i> , <i>pcoA/copA</i>	20	16
<i>Pseudomonas synxantha</i> Cb27	Mackerel	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>pcoA/copA</i>	36	16
<i>Pseudomonas synxantha</i> Lbi15	Sea bass	<i>aadA1</i> , <i>pcoA/copA</i>	20	8
<i>Pseudomonas synxantha</i> Lbi16	Sea bass	<i>pcoA/copA</i>	24	8
<i>Pseudomonas synxantha</i> Lbi25	Sea bass	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i> , <i>aadA1</i> , <i>pcoA/copA</i>	24	16
<i>Pseudomonas synxantha</i> 4C32	Squid	<i>sul1</i> , <i>bla</i> _{PSE} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>pcoA/copA</i>	36	16
<i>Pseudomonas synxantha</i> 4B31	Anchovy	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>pcoA/copA</i>	36	16
<i>Pseudomonas</i> spp. B7	Anchovy	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i> , <i>bla</i> _{IMP} , <i>aadA1</i> , <i>pcoA/copA</i>	36	8
<i>Pseudomonas</i> spp. Cb212	Mackerel	<i>pcoA/copA</i>	36	16
<i>Shewanella baltica</i> 4Sd53	Sardine	<i>sul1</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	16	4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> S14	Salmon	<i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(6')-Ib</i>	32	16
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> S22	Salmon	<i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(6')-Ib</i>	32	16
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> S25	Salmon	<i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	32	16
<i>Acinetobacter oleivorans</i> L123	Prawn	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	24	4
<i>Aeromonas salmonicida</i> Cb22	Mackerel	<i>sul1</i> , <i>bla</i> _{TEM}	20	8

(Continued)

TABLE 3 | Continued

Isolate	Food source	Genetics determinants of resistance	CuSO ₄ (MIC)	ZnCl ₂ (MIC)
<i>Aeromonas salmonicida</i> Mj2	Mussel		12	8
<i>Aeromonas salmonicida</i> L124	Shrimp		32	8
<i>Aeromonas</i> spp. Do11	Gilthead seabream	<i>sul1</i> , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	24	4
<i>Proteus mirabilis</i> T215	Blue shark	<i>qacEΔ1</i> , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>aadA1</i>	32	16
<i>Listeria innocua</i> 4C21	Squid	<i>bla</i> _{PSE}	12	4

MIC, minimum inhibitory concentration (in mM).

from different sources: anchovies, black mackerel and sea bass. By contrast, *cmlA* was not detected in any isolate. The aminoglycoside resistance determinant *aadA1* was detected in six isolates, five of which belonged to genus *Pseudomonas* and one to *Proteus*, while *aac(6')-Ib* was detected in five isolates (including three from genus *Acinetobacter* isolated from salmon, one *Shewanella* and one *Pseudomonas*).

Resistance to Copper and Zinc

A 26.60% of the 30 isolates tested were able to grow in the presence of 24 mM CuSO₄, and still 23.30% were able to grow at 32 mM of the copper salt (Table 3). Regarding zinc tolerance, a 46.60% of the isolates were able to grow in the presence of 8 mM ZnCl₂. However, all isolates tested were inhibited by 16 mM ZnCl₂.

Study of the genetic determinants for metal resistance (Table 3) yielded positive results for the plasmid-borne multicopper oxidase gene *pcoA/copA* (36.66% of selected isolates) and the DNA binding repressor protein gene *pcoR* (6.66%), and for the zinc-chromate resistance gene *chrB* (13.33%). The remaining metal resistance genes investigated were not detected.

DISCUSSION

In the present study, biocide tolerance and antibiotic resistance were detected among bacteria isolated from seafoods. Biocides are used for many different purposes, including health care products and in disinfection processes in the food industry. For example, benzalkonium chloride is used for water treatment, general site disinfection, fish parasite removal, and prevention of infectious disease in fish and shellfish. As a result, large amounts of biocides arrive to waters. The impact of triclosan on aquatic bacterial communities has been described (Dann and Hontela, 2011; McNamara et al., 2014). Previous contact with biocides as well as natural background resistance could explain the biocide tolerances observed in the present study. It is also worth noting that there were positive correlations not only for tolerance to biocides of the same chemical group but also between biocides from different groups. However, there were differences

between polyguanides, since poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride showed positive correlation with several other biocides while chlorhexidine did not. These results could be explained by differences in chemical formula, mechanisms of adaptation (including intrinsic resistance), and also by the development of specific mechanisms of tolerance upon exposure to multiple biocides.

A relatively high percentage of isolates were resistant to at least one biocide and at least one antibiotic, and there were significant ($P < 0.05$) positive correlations between biocide tolerance and antibiotic resistance. These results reinforce the general concern that the use of biocides may co-select for antibiotic resistance (SCENIHR, 2009; Ortega-Morente et al., 2013; Wales and Davies, 2015). Cross-resistance between antibiotics and biocides and between different biocides has been reported for different bacteria, like for example *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert et al., 2001; Lavilla Lerma et al., 2015). Furthermore, previous studies have shown that adaptation to biocides by repeated exposure results in an increased resistance to antibiotics (Gadea et al., 2016, 2017a). It is worth noting that there were also some positive correlations between tolerance/resistance to biocides, antibiotics, and other antimicrobials. For example, the phenolic biocide triclosan showed positive correlation with a lower sensitivity to the phenolic compound thymol (but not with carvacrol), and the antibiotic ampicillin also showed positive correlation with thymol. Previous studies have shown that exposure to plant essential oils (which are rich in phenolic compounds) such as pine oil resulted in the selection of mutants with deregulated *mar* operon that had decreased susceptibility to a range of antimicrobial compounds (including antibiotics and biocides) as a consequence of reduced cell permeability and increased efflux pump activity (Moken et al., 1997; Ortega-Morente et al., 2013). It is worth mentioning that the chemical preservatives sodium lactate and trisodium phosphate only showed moderate positive correlations with the antibiotics ampicillin and imipenem, but not with biocides. A recent study indicated that bacteria adapted to quaternary ammonium compounds under laboratory conditions showed a generalized increased tolerance to preservatives (such as 4-hydroxybenzoic acid, thyme, and clove oil, sodium, and potassium nitrates, potassium sorbate), while the opposite was observed in the case of triclosan (Gadea et al., 2017b).

Sulfonamides potentiated with trimethoprim or ormetoprim and florfenicol are some of the antibiotics commonly used in aquaculture (Hernández Serrano, 2005). In the present study, the sulfonamide resistance *sul1* gene was the genetic determinant detected most frequently. Sulfonamide resistance is most often linked to Class I integrons. These mobile genetic elements tend to accumulate different antibiotic resistance genes and also biocide tolerance genes like *qacEΔ1*. However, *qacEΔ1* was detected in combination with *sul1* only in the *A. calcoaceticus* isolates, and PCR amplification with a forward primer for *qacEΔ1* and a reverse primer for *sul1* did not suggest a close physical location of the two genes unless they were in opposite direction. Class 1 resistance integrons are located on mobile elements like transposons and plasmids and are widely distributed among clinical strains and also in environmental isolates, and play an

important role as reservoirs of antimicrobial resistance genes (L'Abée-Lund and Sørum, 2001; Stokes and Gillings, 2011; Koczura et al., 2013, 2014). Remarkably, one study carried out at aquaculture facilities in the northern Baltic Sea (Finland) reported that antibiotic resistance genes for sulfonamides (*sul1* and *sul2*) and trimethoprim (*dfrA1*) and an integrase gene for a class 1 integron (*intI1*) persisted in sediments below fish farms at very low antibiotic concentrations during a 6-year observation period (Muziasari et al., 2014). Presumably, antimicrobial resistance genes could spread in marine sediments to other bacteria that colonize non-aquaculture fish and from these to seafood processing environments. This could explain the finding of *sul1* in bacteria isolated in the present study from fish like sardines, anchovies, Atlantic horse mackerel, sea bass, gilthead seabream, and salmon, or from squid. Furthermore, in a number of cases, bacterial isolates carrying *sul1* also tested positive for the florfenicol resistance gene *floR*, which can also be associated with Class 1 integrons (Toleman et al., 2007; Lin et al., 2016).

Aquaculture heavily depends on the use of antibiotics (Hernández Serrano, 2005), and several studies have reported on antimicrobial resistance in bacteria from aquaculture ecosystems (e.g., Shah et al., 2014; Huang et al., 2015; Xiong et al., 2015; Watts et al., 2017). Remarkably, one of the two isolates from the present study with broadest spectra of antimicrobial resistance (identified as *A. oleivorans*) was isolated from prawns grown in aquaculture. The *A. oleivorans* strain from the present study was resistant to 10 antimicrobials and tested positive for the genetic determinants *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M}. Since the prawns were boiled and frozen and then sold unfrozen over the counter on ice, there is a possibility that this strain arrived to the food by cross contamination during handling. Boiled prawns are ready to eat, therefore the bacteria with multiple antibiotic resistance together with their antibiotic resistance genes could be passed from prawns to humans. Acinetobacters are inhabitants of soil and water in addition to being opportunistic pathogens for humans, and the human-pathogenic strains are known to exhibit both intrinsic and acquired resistance to a wide variety of antimicrobials (Doughari et al., 2011). It is also worth noting that the remaining acinetobacters detected in the present study (all of them identified as *A. oleivorans*) were isolated from raw salmon slices, also grown in aquaculture. They were resistant to a lower number of antibiotics (4 and 6), but all of them tested positive for the genetic determinants *qacEΔ1*, *sul1* and *aac(6')-Ib*, and two also were positive for the extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{TEM}. *A. oleivorans* was described as a diesel-oil and n-hexadecane-degrading bacterium isolated from a rice paddy (Kang et al., 2011). So far, antibiotic resistance of non-pathogenic *Acinetobacter* species has been weakly explored, but results from the present study suggest that they could be an important reservoir of antimicrobial resistance traits.

A 14.94% of the 87 isolates from the present study were resistant to imipenem. Carbapenems were the last β -lactams retaining nearuniversal anti-Gram-negative activity, but carbapenemase genes are spreading, conferring resistance (Nordmann et al., 2011). Furthermore, among the metallo- β -lactamases investigated in the present study, the imipenemase

(IMP), and the New Delhi metallo- β -lactamase NDM-1 gene were detected in two isolates, both belonging to *Pseudomonas*. Several metallo- β -lactamases encoded by mobile DNA have emerged in important Gram-negative pathogens (Cornaglia et al., 2011). NDM has been reported mainly in *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli*, but it has also been found in a variety of other members of the *Enterobacteriaceae*, including *Acinetobacter* spp., in *Pseudomonas* spp., and in *Vibrio cholerae* (Poirel et al., 2011; Walsh et al., 2011; Mataseje et al., 2016). In *Pseudomonas aeruginosa*, the chromosomal *bla*_{NDM-1} gene has been reported to be located within a Class 1 integron bearing insertion sequence (IS) common region 1 (ISCR1) in a Tn402-like structure (Janvier et al., 2013; Jovicic et al., 2013). Remarkably, the integron also contained the QAC resistance determinant *qacE Δ 1* and the sulfonamide resistance gene *sul1*. A similar gene array has been reported for the *bla*_{NDM-1} regions from *E. coli* transferable plasmid pNDM15-1078 (Mataseje et al., 2016). Furthermore, *bla*_{NDM-1} frequently appears in association with *ble*_{MBL} gene that confers resistance to bleomycin, a glycopeptide antibiotic that is naturally produced by *Streptomyces verticillus*. It is possible that bleomycin-like molecules contribute to selective pressure, leading to the further spread of NDM producers in the environment (Mataseje et al., 2016).

All *Aeromonas* isolates from the present study were resistant to chlorhexidine, ampicillin and imipenem. In addition two of them tested positive for *sul1* and *bla*_{TEM} and one also was positive for *bla*_{CTX-M}. *Aeromonas* are widely distributed in aquatic environments (Holmes et al., 1996). The genus includes species pathogenic for fish (like *A. salmonicida* and others) and humans. In one study on ampicillin-resistant isolates from estuarine waters, Henriques et al. (2006) detected the presence of the integrase gene (along with other genes associated with Class I integrons) in *Aeromonas* strains. The authors also detected the presence of β -lactamase genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CphA}, and *bla*_{OXA-B} in *Aeromonas* strains. Remarkably, the *bla*_{OXA-B} detected in *Aeromonas* sp. and *A. hydrophila* was associated with Class I integrons. Another study on *Aeromonas* isolated from nine freshwater trout farms in Australia reported the presence of *sul1* together with other antibiotic resistance genes typically associated with Class I integrons (Ndi and Barton, 2011). However, the β -lactamase genes investigated (*bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}) were not detected. Further studies should be carried out in order to determine the possible association of the β -lactamase genes detected in the *Aeromonas* isolates from present study with Class I integrons.

In the present study, one isolate resistant to cefotaxime, ceftazidime, streptomycin and nalidixic acid was identified as *Listeria innocua*. This isolate tested positive for the β -lactamase resistance gene *bla*_{PSE}. Previous studies have reported on antimicrobial resistance in *Listeria* spp. isolated from raw fish and open-air fish market environment (Jamali et al., 2015). The authors reported a high resistance of *L. monocytogenes* to tetracycline and penicillin G in agreement with other studies (Rodas-Suárez et al., 2006; Fallah et al., 2013). Another work reported a high resistance level to ampicillin, cefotaxime (100%), and penicillin (57%) in seafood isolates of *L. monocytogenes* (Abdollahzadeh et al., 2016). We could speculate that the *L.*

innocua isolated in the present study from squid originated from the seafood handling and processing environment. Although this is a non-pathogenic species, the results would suggest that different species of *Listeria* in seafood processing environments can act as reservoirs for antimicrobial resistance traits.

Exposure to low concentrations of antibiotics, disinfectants, chemical pollutants, and metals can act as a selective force leading to resistance processes among indigenous bacterial populations (Martinez, 2009). There is a concern that exposure to metals may co-select for antibiotic resistance. In the present study, isolates capable of growing at high concentrations of copper sulfate, and zinc chloride included representatives of *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, and *Proteus*. The observed metal tolerance could be due to direct exposure to these metals in the environment. Furthermore, the multicopper oxidase gene *pcoA/copA* was detected in several *Pseudomonas* strains that were also positive for different antibiotic resistance genes (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{PSE}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *aadA1*, *aac(6')*-*Ib*, *sul1*, *sul2*, *floR*). The copper-inducible system *copABCDRS* was first described within the plasmid pPT23D in *P. syringae* (Cha and Cooksey, 1991) and is homologous to the *pco* system found on the conjugative plasmid pRJ1004 from *E. coli*. In addition to the plasmid-borne system, chromosomal P-type ATPases are responsible for conferring tolerance to metals like copper, zinc, cobalt, chromium, and cadmium (Teitzel and Parsek, 2003). As indicated by Berendonk et al. (2015), selective pressures present in natural environments such as rivers and lakes as a result of human practices are leading to the occurrence of an increasing number of multi-drug resistant environmental *Pseudomonas* isolates (Berendonk et al., 2015). Nevertheless, in the study of the resistome of *P. aeruginosa* E67, an epiphytic isolate from a metal-contaminated estuary, physical links between metal and antibiotic resistance genes were not identified, suggesting a predominance of cross-resistance associated with multidrug efflux pumps (Teixeira et al., 2016). Bacterial multidrug efflux pumps can accommodate a variety of antimicrobials, including dyes, antibiotics, and biocides (Poole, 2007). Nevertheless, a possible association of plasmidic *pcoA/copA* with antibiotic resistance genes in *Pseudomonas* deserves to be further investigated.

In conclusion results from the present study clearly indicate that bacteria from seafoods carry resistance traits against diverse antimicrobials. The possible role of these bacteria in spread of antimicrobial resistance through the food chain deserves further investigation. It is also important to find alternative ways to manage antimicrobial resistance. Biological methods such as the use of probiotics (Tan et al., 2016; Banerjee and Ray, 2017) or the application of bacteriophages (Letchumanan et al., 2016; Torres-Barceló et al., 2016; Parmar et al., 2017) could be promising alternatives to classical antimicrobials.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JR carried out seafood sampling, microbiological analysis and PCR investigation of genetic determinants of resistance. MG

participated in planning and supervision of the experimental work and contributed with strain identification and preparation of PCR experiments. RP contributed with data analysis and preparation of graphical material for the manuscript. RL and AG carried out global analysis of the results and wrote the manuscript.

REFERENCES

- Abdollahzadeh, E., Ojagh, S. M., Hosseini, H., Ghaemi, E. A., Irajian, G., and Naghizadeh, H. M. (2016). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microb. Pathog.* 100, 70–74. doi: 10.1016/j.micpath.2016.09.012
- Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Canamero, M., et al. (2005). Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 383–397. doi: 10.1016/j.syapm.2005.01.007
- Adaikkalam, V., and Swarup, S. (2002). Molecular characterization of an operon, cueAR, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida*. *Microbiology* 148, 2857–2867. doi: 10.1099/00221287-148-9-2857
- Badar, U., Ahmed, N., Shueb, E., and Gadd, G. M. (2014). Identification of the *pco* operon in *Enterobacter* species isolated from contaminated soil. *Int. J. Adv. Res.* 2, 227–233. doi: 10.21474/IJAR01
- Banerjee, G., and Ray, A. K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* 115, 66–77. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.01.016
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 310–317. doi: 10.1038/nrmicro3439
- Bertrand, S., Weill, F. X., Cloeckaert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., et al. (2006). Clonal emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* 44, 2897–2903. doi: 10.1128/JCM.02549-05
- Bjornsdottir-Butler, K., Green, D. P., Bolton, G. E., and McClellan-Green, P. D. (2015). Control of histamine-producing bacteria and histamine formation in fish muscle by trisodium phosphate. *J. Food Sci.* 80, M1253–M1258. doi: 10.1111/1750-3841.12875
- Braoudaki, M., and Hilton, A. C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 42, 73–78. doi: 10.1128/JCM.42.1.73-78.2004
- Brown, N. L., Rouch, D. A., and Lee, B. T. O. (1992). Copper resistance systems in bacteria. *Plasmid* 27, 41–51. doi: 10.1016/0147-619X(92)90005-U
- Cavaco, L. M., Hasman, L., and Aarestrup, F. M. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Vet. Microbiol.* 150, 344–348. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.014
- Cha, J. S., and Cooksey, D. A. (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Microbiology* 88, 8915–8919. doi: 10.1073/pnas.88.20.8915
- Chihomvu, P., Stegmann, P., and Pillay, M. (2015). Characterization and structure prediction of partial length protein sequences of *pcoA*, *pcoR* and *chrB* genes from heavy metal resistant bacteria from the Klip River, South Africa. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 7352–7374. doi: 10.3390/ijms16047352
- Chiu, C. H., Su, L. H., Chu, C. H., Wang, M. H., Yeh, C. M., Weill, F. X., et al. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2354–2358. doi: 10.1128/JCM.00171-06
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., and Schweizer, H. P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 428–432. doi: 10.1128/AAC.45.2.428-432.2001
- Chuanchuen, R., Khemtong, S., and Padungtod, P. (2007). Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. *S. East Asian. J. Trop. Med. Pub. Health* 38, 855–862.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., and Rossolini, G. M. (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11, 381–393. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70056-1
- Crémet, L., Caroff, N., Dauvergne, S., Reynaud, A., Lepelletier, D., and Corvec, S. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathol. Biol.* 59, 151–156. doi: 10.1016/j.patbio.2009.04.003
- Dann, A. B., and Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31, 285–311. doi: 10.1002/jat.1660
- De Toro, M., Sáenz, Y., Cercenado, E., Rojo-Bezares, B., and García-Campello, M., Undabeitia, et al. (2011). Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *Int. Microbiol.* 14, 173–181. doi: 10.2436/20.1501.01.146
- CLSI (2015). *Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement*, Vol. 35. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Document M100–S25.
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., and Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp: an overview. *Microb. Environ.* 26, 101–112. doi: 10.1264/jisme2.ME10179
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2012). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011*. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm. Available online at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2013). *Epidemiological Update: Multistate Outbreak of Salmonella Stanley Infection*. Solna: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).
- European Food Safety Authority (EFSA) (2010). The community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004–2007. *EFSA J.* 8:1309. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1309
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2013). The european union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA J.* 11:3196. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3196
- Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., and Mahzounieh, M. (2013). Occurrence and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. *Food Cont.* 34, 630–636. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.06.015
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2016). *Globefish Highlights-Issue 3/2016*. Rome: FAO.
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M. A., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., and Ortega, E. (2016). Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Res. Int.* 85, 131–143. doi: 10.1016/j.foodres.2016.04.033
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., and Ortega, E. (2017a). Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiol.* 63, 58–71. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.037
- Gadea, R., Glibota, N., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., and Ortega, E. (2017b). Effects of exposure to biocides on susceptibility to essential oils and chemical

- preservatives in bacteria from organic foods. *Food Cont.* 80, 176–182. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.05.002
- Gaze, W. H., Abdoulsam, N., Hawkey, P. M., and Wellington, E. M. H. (2005). Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1802–1807. doi: 10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005
- Gómez-Sanz, E., Kadlec, K., Feßler, A. T., Zarazaga, M., Torres, C., and Schwarz, S. (2013). Novel erm(T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3275–3282. doi: 10.1128/AAC.00171-13
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., and Esteban, M. A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 1541–1560. doi: 10.3390/ijms13021541
- Guerra, B., Soto, S. M., Argüelles, J. M., and Mendoza, C. (2001). Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a Class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:–]. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1305–1308. doi: 10.1128/AAC.45.4.1305-1308.2001
- Hansen, L. S., Jensen, L. B., and Sørensen, H. I. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 145–147. doi: 10.1093/jac/dkm167
- Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., and Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* 157, 938–947. doi: 10.1016/j.resmic.2006.09.003
- Hernández Serrano, P. (2005). *Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper 469, FAO, Rome.
- Hobman, J. L., and Crossman, L. C. (2014). Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* 64, 471–497. doi: 10.1099/jmm.0.023036-0
- Holmes, P., Nicholls, L. M., and Sartory, D. P. (1996). “The ecology of mesophilic aeromonas in the aquatic environment,” in *The Genus Aeromonas*, eds B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling, and S. Joseph (New York, NY: John Wiley and Sons), 127–150.
- Huang, Y., Zhang, L., Tiu, L., and Wang, H. H. (2015). Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front. Microbiol.* 6:914. doi: 10.3389/fmicb.2015.00914
- Iovleva, A., and Doi, Y. (2017). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clin. Lab. Med.* 37, 303–315. doi: 10.1016/j.cl.2017.01.005
- Jamali, H., Paydar, M., Ismail, S., Looi, C. Y., Wong, W. F., Radmehr, B. et al. (2015). Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. *BMC Microbiol.* 15:144. doi: 10.1186/s12866-015-0476-7
- Janvier, F., Jeannot, K., Tesse, S., Robert-Nicoud, M., Delacour, H., Rapp, C., et al. (2013). Molecular characterization of blaNDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3408–3411. doi: 10.1128/AAC.02334-12
- Jovcic, B., Lepsanovic, Z., Begovic, J., Rakonjac, B., Perovanovic, J., Topi Sirovic, L., et al. (2013). The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the blaNDM-1 gene in a novel genetic context. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3405–3407. doi: 10.1128/AAC.02312-12
- Kamika, I., and Momba, M. N. B. (2013). Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiol.* 13:28. doi: 10.1186/1471-2180-13-28
- Kang, Y. S., Jung, J., Jeon, C. O., and Park, W. (2011). *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J. Microbiol.* 49, 29–34. doi: 10.1007/s12275-011-0315-y
- Kim, Y. T., Jang, J. H., Kim, H. C., Kim, H., Lee, K. R., Park, K. S., et al. (2011). Identification of strain harboring both aac(6′)-Ib and aac(6′)-Ib-cr variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *BMB Rep.* 44, 262–266. doi: 10.5483/BMBRep.2011.44.4.262
- Koczura, R., Mokracka, J., Barczak, A., Krysiak, N., Kubek, M., and Kaznowski, A. (2013). Association between the presence of class 1 integrons virulence genes and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microb. Ecol.* 65, 84–90. doi: 10.1007/s00248-012-0101-3
- Koczura, R., Semkowska, A., and Mokracka, J. (2014). Integron-bearing Gram-negative bacteria in lake waters. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 514–519. doi: 10.1111/lam.12307
- Kücken, D., Feucht, H. -H., and Kaulfers, P. -M. (2000). Association of qacE and qacEΔ1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 95–98. doi: 10.1016/S0378-1097(99)00636-9
- L’Abée-Lund, T. M., and Sørum, H. (2001). Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microbial. Drug Res.* 7, 263–272. doi: 10.1089/10766290152652819
- Lambert, R. J. W., Joynson, J., and Forbes, B. (2001). The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *J. Appl. Microbiol.* 91, 972–984. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01460.x
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Casado Mu-oz, M. C., Gálvez, A., and Abriouel, H. (2015). Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food Microbiol.* 51, 33–44. doi: 10.1016/j.fm.2015.04.010
- Letchumanan, V., Chan, K.-G., Pusparajah, P., Saokaew, S., Duangjai, A., Goh, B.-H., et al. (2016). Insights into bacteriophage application in controlling *Vibrio* species. *Front. Microbiol.* 7:1114. doi: 10.3389/fmicb.2016.01114
- Lin, M., Wu, X., Yan, Q., Ma, Y., Huang, L., Qin, Y., et al. (2016). Incidence of antimicrobial-resistance genes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from eels and aquaculture ponds. *Dis. Aquat. Organ.* 120, 115–123. doi: 10.3354/dao03013
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., and Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Front. Microbiol.* 3:287. doi: 10.3389/fmicb.2012.00287
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902. doi: 10.1016/j.envpol.2009.05.051
- Mataseje, L. F., Peirano, G., Church, D. L., Conly, J., Mulvey, M., and Pitout, J. D. (2016). Colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 654 with blaNDM-1 arrives in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1794–1800. doi: 10.1128/AAC.02591-15
- McNamara, P. J., LaPara, T. M., and Novak, P. J. (2014). The impacts of triclosan on anaerobic community structures, function, and antimicrobial resistance. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7393–7400. doi: 10.1021/es501388v
- Medardus, J. J., Molla, B. Z., Nicol, M., Morrow, W. M., Rajala-Schultz, P. J., Kazwala, R., et al. (2014). In-feed use of heavy metal micronutrients in U.S. swine production systems and its role in persistence of multidrug-resistant *Salmonellae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2317–2325. doi: 10.1128/AEM.04283-13
- Moken, M. C., McMurry, L. M., and Levy, S. B. (1997). Selection of multiple antibiotic resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2770–2772.
- Mulvey, M. R., Boyd, D., and Olson, A. B. (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microb. Infect.* 8, 1915–1922. doi: 10.1016/j.micinf.2005.12.028
- Muziasari, W. I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., et al. (2014). Sulphonamide and trimethoprim resistance genes persist in sediments at Baltic Sea aquaculture farms but are not detected in the surrounding environment. *PLoS ONE* 9:e92702. doi: 10.1371/journal.pone.0092702
- Ndi, O. L., and Barton, M. D. (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* 34, 589–599. doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x
- Nies, A., Nies, D. H., and Silver, S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265, 5648–5653.
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R., and Livermore, D. M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 19, 588–595. doi: 10.1016/j.tim.2011.09.005
- Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M. A., Grande-Burgos, M. J., Abriouel, H., Pérez-Pulido, R., and Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 13–25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., and Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6′)-Ib-cr encoding

- a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3953–3955. doi: 10.1128/AAC.00915-06
- Parmar, K. M., Hathi, Z. J., and Dafale, N. A. (2017). Control of multidrug-resistant gene flow in the environment through bacteriophage intervention. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 1007–1029. doi: 10.1007/s12010-016-2265-7
- Patel, S. (2015). Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. *Food Addit. Contam. A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 32, 1049–1164. doi: 10.1080/19440049.2015.1040081
- Poiriel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2011). Genetic features of bla_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5403–5407. doi: 10.1128/AAC.00585-11
- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals Med.* 39, 162–176. doi: 10.1080/07853890701195262
- Ramakrishnan, K., Rajagopalan, S., Nair, S., Kenchappa, P., and Chandrakesan, S. D. (2014). Molecular characterization of metallo β -lactamase producing multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from various clinical samples. *Indian. J. Pathol. Microbiol.* 57, 579–582. doi: 10.4103/0377-4929.142670
- Rodas-Suárez, O., Flores-Pedroche, J., Betancourt-Rule, J., Qui-ones-Ramírez, E. I., and Vázquez-Salinas, C. (2006). Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7410–7412. doi: 10.1128/AEM.00956-06
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (2009). *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*. Available online at: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_021.pdf (Accessed May 2, 2017)
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., et al. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3996–4001. doi: 10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004
- Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., et al. (2010). Class 1 integrons lacking qacE Δ 1 and sul1 genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origin. *Vet. Microbiol.* 144, 493–497. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.01.026
- Shah, S. Q., Cabello, F. C., L'abée-Lund, T. M., Tomova, A., Godfrey, H. P., Buschmann, et al. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environ. Microbiol.* 16, 1310–1320. doi: 10.1111/1462-2920.12421
- Stokes, H. W., and Gillings, M. (2011). Gene flow mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 790–819. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x
- Tan, L. T.-H., Chan, K.-G., Lee, L.-H., and Goh, B.-H. (2016). Streptomyces bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Front. Microbiol.* 7:79. doi: 10.3389/fmicb.2016.00079
- Teitzel, G. M., and Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2313–2320. doi: 10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003
- Teixeira, P., Tação, M., Alves, A., and Henriques, I. (2016). Antibiotic and metal resistance in a ST395 *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate: a genomics approach. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 75–81. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.086
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., Bennett, D. M., Jones, R. N., and Walsh, T. R. (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 559–565. doi: 10.3201/eid1304.061378
- Torres-Barceló, C., Franzon, B., Vasse, M., and Hochberg, M. E. (2016). Long-term effects of single and combined introductions of antibiotics and bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol. Appl.* 9, 583–595. doi: 10.1111/eva.12364
- Trevors, J. T., Oddie, K. M., and Belliveau, B. H. (1985). Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 39–54. doi: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb01181.x
- Wales, A. D., and Davies, R. H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics* 4, 567–604. doi: 10.3390/antibiotics4040567
- Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., and Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 355–362. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7
- Wang, W., Li, M., and Li, Y. (2015). Intervention strategies for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: a review. *J. Food Sci.* 80, R10–R19. doi: 10.1111/1750-3841.12727
- Watermann, B. T., Daehne, B., Sievers, S., Dannenberg, R., Overbeke, J. C., Klijnstra, J. W., et al. (2005). Bioassays and selected chemical analysis of biocide-free antifouling coatings. *Chemosphere* 60, 1530–1541. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.02.066
- Watts, J. E. M., Schreier, H. J., Lanska, L., and Hale, M. S. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Mar. Drugs* 15:e158. doi: 10.3390/md15060158
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- WHO (2001). *Environmental Health Criteria* 221. Geneva: Zinc World Health Organization.
- Wong, M. H., and Chen, S. (2013). First detection of oqxAB in *Salmonella* spp. isolated from food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 658–660. doi: 10.1128/AAC.01144-12
- Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., et al. (2015). Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microb. Ecol.* 70, 425–432. doi: 10.1007/s00248-015-0583-x
- Yebrá, D. M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology-past, present and future step toward efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.* 50, 75–104. doi: 10.1016/j.porgcoat.2003.06.001

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Romero, Grande Burgos, Pérez-Pulido, Gálvez and Lucas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTÍCULO 3

**Maria Jose Grande Burgos, Jose Luis Romero, Rubén Pérez Pulido,
Antonio Cobo Molinos, Antonio Gálvez, Rosario Lucas**
**Analysis of potential risks from the bacterial communities associated with
air-contact surfaces from tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish farming**
***Environmental Research* (en prensa)**



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com

Analysis of potential risks from the bacterial communities associated with air-contact surfaces from tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish farming[☆]

Maria Jose Grande Burgos, Jose Luis Romero, Rubén Pérez Pulido, Antonio Cobo Molinos, Antonio Gálvez*, Rosario Lucas

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Tilapia
Aquaculture
Bacterial diversity
Microbiological risks

ABSTRACT

Tilapia farming is a promising growing sector in aquaculture. Yet, there are limited studies on microbiological risks associated to tilapia farms. The aim of the present study was to analyse the bacterial communities from solid surfaces in contact with air in a tilapia farm in order to evaluate the presence of bacteria potentially toxigenic or pathogenic to humans or animals. Samples from a local tilapia farm (tank wall, aerator, water outlets, sink and floor) were analyzed by high throughput sequencing technology. Sequences were assigned to operational taxonomic units (OTUs). *Proteobacteria* was the main phylum represented in most samples (except for one). *Cyanobacteria* were a relevant phylum in the inner wall from the fattening tank and the wet floor by the pre-fattening tank. *Bacteroidetes* were the second phylum in relative abundance for samples from the larval rearing tank and the pre-fattening tank and one sample from the fattening tank. *Fusobacteria* showed highest relative abundances in samples from the larval rearing tank and pre-fattening tank. Other phyla (*Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Gemmatimonadetes* or *Fibrobacteres*) had lower relative abundances. A large fraction of the reads (ranging from 43.67% to 72.25%) were assigned to uncultured bacteria. Genus *Acinetobacter* (mainly *A. calcoaceticus/baumanni*) was the predominant OTU in the aerator of the fattening tank and also in the nearby sink on the floor. The genera *Cetobacterium* and *Bacteroides* showed highest relative abundances in the samples from the larval rearing tank and the pre-fattening tank. Genera including fish pathogens (*Fusobacterium*, *Aeromonas*) were only detected at low relative abundances. Potential human pathogens other than *Acinetobacter* were either not detected or had very low relative abundances (< 0.01%). The results of the study suggest that the main risk factors to be monitored in tilapia farm are putative human pathogenic *Acinetobacter* and potential cyanotoxin-producing cyanobacteria.

1. Introduction

Tilapia is an aquaculture food commodity of economic and global importance (Rafael, 2008). In 2014, the world aquaculture production of tilapia and other cichlids amounted 5308020 t (FAO, 2014). In Spain, tilapia farming is still very limited, but the sector is expected to rise in the near future (FAO, 2017). Tilapia farming generates and anthropogenic environment where different microbial communities develop. Deciphering the composition of bacterial communities in aquaculture ecosystems can be relevant for safety assessment of the food, evaluation of the risk of exposure to human pathogens, and adopting

control measures intended to decrease the spread of possible pathogenic bacteria.

One study on bacteria associated with tilapia farming (pond water, pond sediment, fish gill and intestine) based on culture-dependent methods (Pakingking et al., 2015) revealed that *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* spp. and *Vibrio cholerae* were the dominant bacteria identified in the gills and intestine of tilapia. These bacteria also dominated in the pond sediment and rearing water, except for the nil isolation of *S. putrefaciens* and *V. cholerae* in the water samples examined, indicating that resident bacteria in the pond water and sediment congruently typify the composition of bacterial micro-

[☆] This work was supported by the University of Jaén (Research Structure AGR230).

* Corresponding author. Present address: Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales. Edif. B3, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n., 23071 Jaén, Spain.

Email address: agalvez@ujaen.es (A. Gálvez)

biota in the gills and intestine of tilapia which under stressful conditions may propel the ascendance of disease epizootics (Pakingking et al., 2015).

Studies based on high-throughput sequencing (HTS) technologies are providing new insight into the microbiota from different environments, including fish and fish farms. By studying the bacterioplankton communities of tilapia ponds, Fan et al. (2016) concluded that the dominant phylum in all water samples were similar, and they included *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes* and *Chlorobi*, distributed in different proportions in the different months and ponds. One study on the composition of water, feed and gut bacteria communities of Nile tilapia larvae revealed the presence of representatives of *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Nitrospirae* and *Planctomycetes* with different relative abundances depending on the sampling environment investigated (Giatsis et al., 2015). Another study analyzed the intestinal microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) after the application of a multi-species probiotic. *Firmicutes* were the dominant phyla in the control group, while reads for *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Nitrospirae*, *Spirochaetes* and the phylum TM6 were detected at lower relative abundances (Standen et al., 2015).

While the microbiota of water, ponds and tilapia gut has been studied to a large extent, there are no previous studies on the bacterial communities from wet surfaces in contact with air, where bacterial biofilms can develop. Such environments could be a source for pathogenic or toxinogenic bacteria. Biofilms are complex structures where bacteria are embedded within a self-produced extracellular matrix (Costerton et al., 1999; Donlan and Costerton, 2002). Biofilm formation confers an increased tolerance to disinfection processes, facilitating persistence of bacteria in the environment (Donlan and Costerton, 2002; Steenackers et al., 2012). Biofilms can be important as reservoirs of bacteria that can further colonize other environments such as the water, food, or animal tissues. Since wet surfaces in contact with air may act as reservoirs of unwanted bacteria that may be protected from disinfection in biofilms, the aim of the present work was to provide insights on the bacterial communities from different wet surfaces in contact with air in a tilapia farm as possible sources of bacteria pathogenic to humans or fish, or relevant for their toxin production capacity.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Samples were taken from a tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish farm in Andalusia in the month of April 2015. The tanks (larval rearing, pre-fattening, fattening) had concrete walls. Water was recirculated and held at a constant temperature of 29 °C. Samples (in triplicate) were taken from wet surfaces in contact with air (Table 1) by rubbing the surfaces (ca. 2 cm² each) with sterile swabs. Samples were kept on ice for not longer than 24 h before analysis. The content of each swab was recovered in 1 ml sterile saline solution inside a sterile Eppendorf test

tube by manual agitation. The process was repeated once with fresh saline solution. The resulting suspensions were centrifuged (13.500×g, 5 min) and the sediments recovered for each sample in triplicate were resuspended into 0.5 ml sterile solution and pooled as a single sample for DNA extraction and further analysis.

2.2. DNA extraction, sequencing and analysis

DNA was extracted by using a GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) following instructions provided by the manufacturer. DNA concentration and quality were measured with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, United Kingdom).

The sequence of the V3-V4 region of 16 S rRNA gene was used as the taxonomic basis to estimate bacterial populations present in the samples (Caporaso et al., 2011) using Illumina technology. Library preparation and sequencing was done at the facilities of Fundación Parque Científico de Madrid (Madrid, Spain). The quality of the DNA was determined by agarose gel electrophoresis. Accurate concentration of DNA in the samples was determined using a fluorimetric method with Quant-IT PicoGreen reagent (Thermo Fischer, Madrid, Spain) in a Quantifluor ST fluorometer (Promega, Alcobendas, Madrid). The oligonucleotide primers used for the first PCR reaction were 16 SV3-V4-CS1 ACAC-TGACGACATGGTTCTACACCTACGGGNGGCWGCAG (forward) and 16SV3-V4-CS2 5' TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGAC-TACHVGGGTATCTAATCC (reverse), where the underlined regions are the CS1 and CS2 Fluidigm adapter nucleotide sequences, while the non-underline sequences are locus-specific sequences targeting conserved regions within the V3 and V4 domains of prokaryotic 16S rRNA genes (Klindworth et al., 2013). Each PCR reaction contained DNA template (~10–12 ng), 5 µl forward primer (1 µM), 5 µl reverse primer (1 µM), 12.5 µl Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), and PCR grade water to a final volume of 25 µl. PCR amplification was carried out as follows: 98 °C × 30 s, 20 cycles of 98 °C × 10 s, 50 °C × 20 s, 72 °C × 20 s, then 72 °C × 2 min and held at 4 °C. PCR products were visualized using agarose gel electrophoresis. Successful PCR products were cleaned using AMPure XP magnetic bead based purification (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Afterwards, a second PCR was applied under the same primers and conditions as above (except that only 8 cycles were completed) to add the individual barcode to each of the samples, as well as to incorporate Illumina-specific sequences in the amplicon libraries. Individual libraries were analyzed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Madrid) to estimate the concentration of the specific PCR products and a pool of samples was made in equimolar amounts. The pool was further cleaned with AMPure XP magnetic beads, and the exact concentration of the library was measured by real time PCR using Illumina specific primers (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Paired-end sequencing of the library was performed on an Illumina MiSeq sequencer (San Diego, CA, USA) using the MiSeq Reagent Kit (v3) with the longest read length set to 2 × 300 base pairs (bp). After demultiplexing, paired end reads were joined together with the fastq-join program (<https://>

Table 1

Description of samples, number of sequences (reads) and observed diversity for 16 S rRNA amplicons analyzed in this study.

Sample name	Origin	No. of reads	Shannon index	Simpson index	Chao1 index
UJA-T3-1	Larval rearing tank aerator	73,925	3.62	0.94	473.50
UJA-T3-2	Larval rearing tank water outlet (to filter)	86,366	3.43	0.93	394.80
UJA-T3-3	Fattening tank inner wall	91,877	3.65	0.95	518.31
UJA-T3-4	Pre-fattening tank water outlet (to filter)	76,598	3.44	0.94	391.00
UJA-T3-5	Pre-fattening tank water overflow (to floor)	76,650	3.46	0.93	456.02
UJA-T3-6	Floor by pre-fattening tank	83,870	3.74	0.94	684.63
UJA-T3-7	Floor by pre-fattening tank	80,165	3.83	0.94	610.00
UJA-T3-8	Fattening tank inner wall	70,542	2.83	0.78	585.01
UJA-T3-9	Fattening tank aerator	76,011	3.13	0.89	397.91
UJA-T3-10	Floor drain by fattening tank and aerator	100,564	2.95	0.83	540.32

expressionanalysis.github.io/ea-utils/). Only reads that had quality value (QV) scores of ≥ 20 for more than 99% of the sequence were extracted for further analysis. All sequences with ambiguous base calls were discarded. After filtering, sequence reads were assigned to operational taxonomic units (OTUs) based on sequence similarity for each read to 16 S rRNA genes from the Era7 Bioinformatics DB7 database which combines the major databases Silva, GreenGenes, RDP, Ena and Refseq (Era7 Bioinformatics, Granada, Spain). Each read was assigned to the taxon corresponding to the Best Blast Hit over a threshold of similarity ($e < 1E-15$). Cluster analysis was done with Statistica (V. 10.0. Statsoft, Palo Alto, CA). Biodiversity indexes were calculated with Microsoft Excel programme.

3. Results

3.1. Bacterial communities from the tilapia farm samples

The numbers of assigned reads after filtering ranged from 70542 for the fattening tank wall to 100564 for the floor drain (Table 1). Reads were assigned to 29 phyla including 227 families and 965 genera in total. Biodiversity indexes (Table 1) indicated a high diversity for all samples, with marked differences between samples for Shannon's diversity index and Chao 1 index.

The relative abundances of the main phyla detected changed according to the sample origin. *Proteobacteria* was the main phylum represented, with highest relative abundances exceeding 65% in samples from the fattening tank aerator and the nearby floor drain (Fig. 1). This phylum had lowest relative abundance (18.66%) in sample UJA-T3-8 from the fattening tank inner wall, where *Cyanobacteria* were the predominant group (55.28%). *Cyanobacteria* were also a relevant phylum in samples from the wet floor by the pre-fattening tank (UJA-T3-6, 12.53%; UJA-T3-7, 19.13%) and less relevant in the fattening tank aerator (UJA-T3-9, 8.12%) and sink (UJA-T3-10, 6.40%). *Bacteroidetes* were the second phylum in relative abundance for many of the samples (ranging from 23.88% to 33.31% for samples from the larval rearing tank and the pre-fattening tank and one sample from the fattening tank). *Fusobacteria* showed highest relative abundances in samples from

the larval rearing tank (UJA-T3-2, 18.39%) and pre-fattening tank (UJA-T3-4, 17.88%; UJA-T3-5, 12.67%). Other phyla such as *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Gemmatimonadetes* or *Fibrobacteres* had lower relative abundances in general or only had a higher relative abundance in a limited number of samples.

A large fraction of the reads (ranging from 43.67% to 72.25%) were assigned to uncultured bacteria (Fig. 2). Among them, uncultured *Bacteroidetes* and uncultured *cyanobacteria* showed highest relative abundances. The first was detected in all samples at relative abundances ranging from 2.85% (UJA-T3-9) to 16.65% (UJA-T3-5). Uncultured *cyanobacteria* showed highest relative abundances in samples UJA-T3-6 (10.76%), UJA-T3-7 (15.15%), UJA-T3-8 (45.16%), UJA-T3-9 (6.98%) and UJA-T3-10 (3.15%).

Genus *Acinetobacter* (mainly *A. calcoaceticus/baumannii*) was the predominant OTU in the aerator of the fattening tank (UJA-T3-9; 27.80% relative abundance) and also in the nearby sink on the floor (UJA-T3-10; 39.16%). *Cetobacterium* (mainly *C. somerae*) had high relative abundances in samples from the water outlet of the larval rearing tank (UJA-T3-2; 18.37%) and the pre-fattening tank water outlet (UJA-T3-4; 17.87%) and water overflow (UJA-T3-5; 12.66%). Genus *Bacteroides* also showed highest relative abundances in the samples from the larval rearing tank (UJA-T3-2; 7.81%) and the pre-fattening tank (UJA-T3-4, 5.66%; UJA-T3-5, 4.40%).

The following genera (Fig. 2) had relative abundances $> 2.0\%$ only in a few samples (*Pseudomonas*, *Flectobacillus*, *Plesiomonas*, *Mycobacterium*) or only in one sample (*Flavobacterium*, *Dyella*, *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Porphyromonas*, *Ideonella*, *Halscomenobacter*, *Planktothrix*, *Phormidium*, *Newskia*, *Silanimonas*, *Rhodanobacter*).

Other genera (not listed in Fig. 2) had relative abundances comprised between 1% and 2% for at least one of the samples (*Nordella*, *Pseudoxanthomonas*, *Thermomonas*, *Lysobacter*, *Shewanella*, *Aeromonas*, *Pedobacter*, *Undibacterium*, *Rubrivax*, *Nitrobacter*, *Actinomyces*, *Prosthecobacter*, *Exiguobacterium*, *Chryseobacterium*, *Anabaena* and *Novosphingobium*).

With respect to specific fish pathogens, OTUs assigned to genus *Flavobacterium* were detected in all samples, at relative abundances

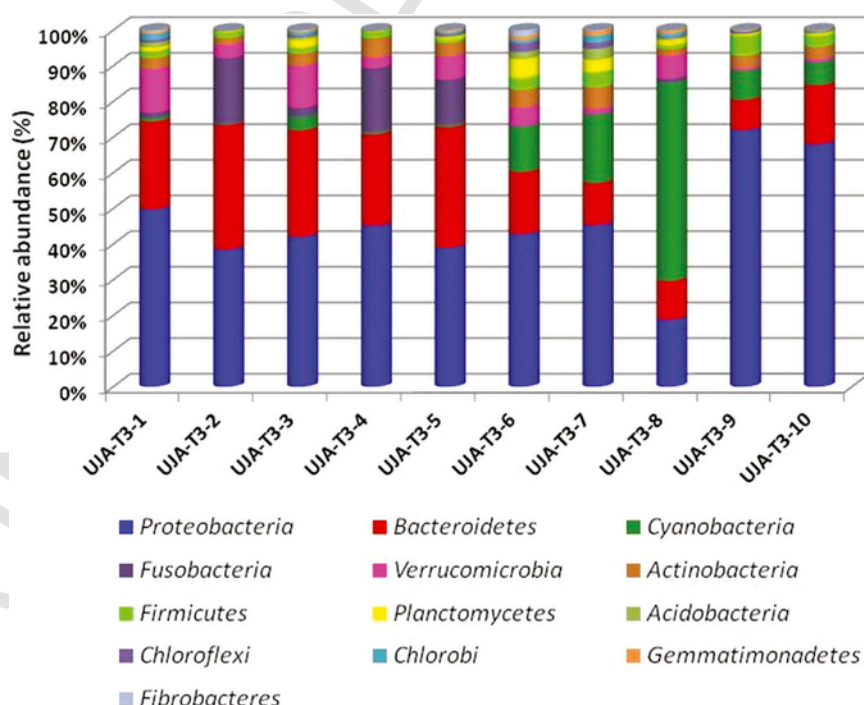


Fig. 1. Relative abundance of OTUs sorted by Phylum based on paired-end 16 S rRNA gene sequencing analysis of DNA from the sampled tilapia farm. Sample codes are described in Table 1.

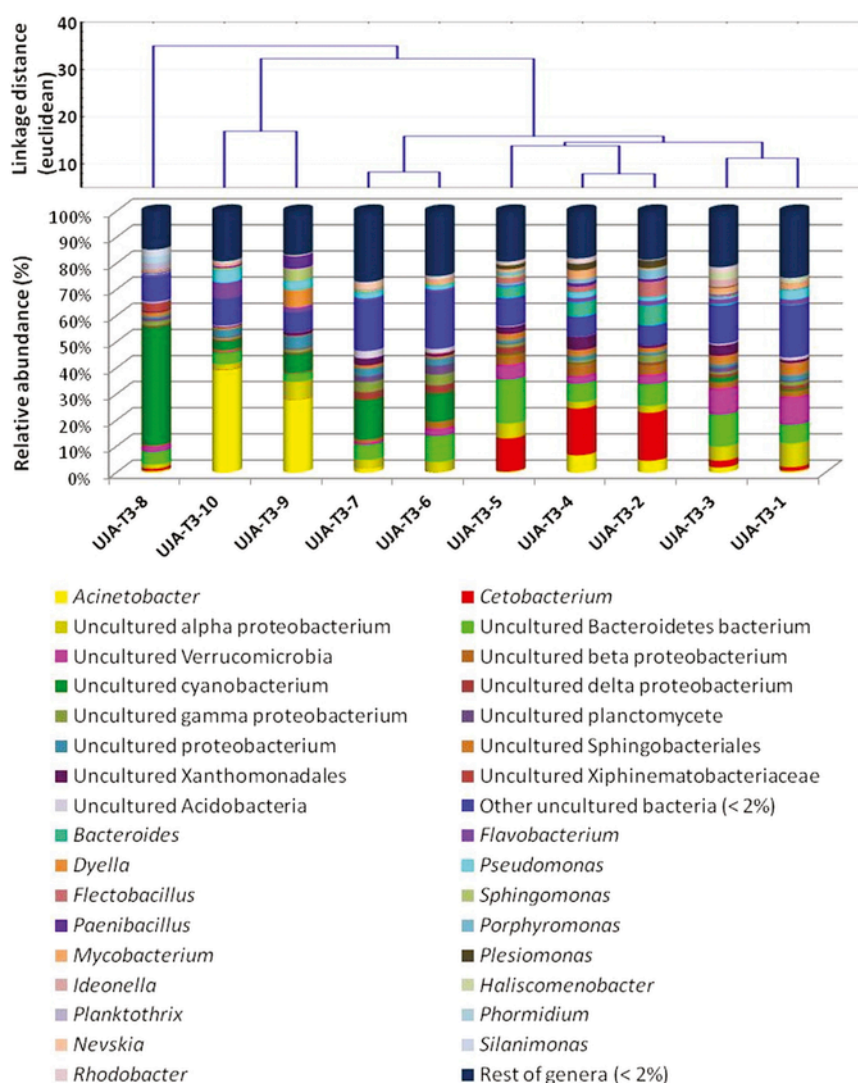


Fig. 2. Cluster analysis of samples. OTUs assigned to species level were sorted by Genus. OTUs assigned to uncultured bacteria were sorted by the corresponding group. Sample codes are described in Table 1.

from 0.60% to 1.90% except for samples from sink on the floor (UJA-T3-10; 6.13%). Nevertheless, the main species detected were *F. cucumis* and *F. indicum* while the fish pathogen *F. columnare* was only detected in two samples and only at relative abundances < 0.01%. *Aeromonas* was also detected in all samples, at relative abundances < 1.7%, but the fish pathogen *A. hydrophila* had a highest relative abundance of only 0.5% (UJA-T3-10), and *A. salmonicida* was not detected. OTUs corresponding to other fish pathogens (*Edwardsiella tarda*, *Francisella* sp., *P. aeruginosa* group, *P. plecoglossicida* *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* or *Photobacterium* sp.) were not detected or had very low relative abundances (< 0.01%).

OTUs corresponding to genera *Escherichia*, *Salmonella* and *Listeria* had relative abundances below 0.01%. Furthermore, most of the reads assigned to genus *Listeria* belonged to *Listeria welshimeri*, and none was assigned to *Listeria monocytogenes*. *Salmonella enterica* accumulated less than 10 counts, and *Escherichia coli* was not detected. OTUs assigned to genus *Legionella* showed highest relative abundances in samples UJA-T3 (0.19%) and UJA-T7 (0.15%). However, the numbers of reads assigned to *Legionella pneumophila* were < 20.

Cluster analysis (Fig. 2) revealed that samples UJA-T3-1 to UJA-T3-7 formed a major cluster clearly separated from the rest of the samples. Within this cluster, highest similarities were observed between samples UJA-T3-6 and UJA-T3-7 (with uncultured cyanobacteria and uncul-

tured gammaproteobacteria as most abundant OTUs) as well as between samples UJA-T3-2 and UJA-T3-4 (sharing high relative abundances of *Cetobacterium* and *Bacteroidetes*). Furthermore, samples from the fattening tank aerator and the nearby sink on the floor also had similar compositions whose main feature was the high relative abundance of *Acinetobacter*-assigned OTUs.

4. Discussion

Fish farming may generate environments where toxinogenic or pathogenic bacteria may proliferate. Wet surfaces in contact with air deserve special attention, because they can behave as bacterial reservoirs and facilitate the spread of microorganisms. Results from the present study revealed that *Acinetobacter*-affiliated OTUs (mainly *A. calcoaceticus/baumanni*) were dominant in at least two samples from the tilapia farm (the aerator by the fattening tank and the close sink on the floor). The majority of *Acinetobacter* species are nonpathogenic, environmental microorganisms, however those species adapted to clinical environments are now causing serious health problems in the nosocomial environment (Wong et al., 2017). Particularly, *Acinetobacter baumannii* has been listed as one of the most important nosocomial pathogens (Joly-Guillouet al, 2005; Peleg et al., 2008; Antunes et al., 2014). This bacterium attaches to and forms biofilm structures on abi-

otic surfaces, and particularly at the liquid–air interfaces (Tomaras et al., 2003). Liquid-air interfaces are important for dissemination of bacteria through aerosols. In view of the obtained results, further studies should be carried out in order to evaluate the presence of *Acinetobacter* in aerosols and the possible risks of exposure for workers in the tilapia farms. Another reason to consider acinetobacters as bacteria of concern in the seafood industry is that environmental isolates may carry antimicrobial resistance traits. Yoon et al. (2014) showed that the amikacin resistance gene *aphA6* coding for an enzyme that confers resistance to amikacin, the most active aminoglycoside for the treatment of nosocomial infections due to *Acinetobacter* spp. originated from the environmental species *Acinetobacter guillouiae*. A recent study from our group reported that *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter oleivorans* strains isolated from salmon slices and prawns sold at supermarkets were multiply resistant to antibiotics (Romero et al., 2017). Furthermore, the *A. calcoaceticus* isolates carried the quaternary compounds resistance gene *qacEΔ1* and the sulphonamide resistance gene *sul1*. Therefore, antibiotic resistance in *Acinetobacter* from fish farming deserves to be investigated.

Regarding other potential human pathogenic bacteria, OTUs assigned to genus *Legionella* were comprised between 0.15% and 0.19% in two samples, but the numbers of reads assigned to *L. pneumophila* were too low to reach a conclusion about the risk of exposure to this bacterium. A recent study (Pereira et al., 2017) reported that the minimum concentration of *L. pneumophila* detected with Illumina MiSeq using universal primers for *Bacteria* was 10^2 genome copies per assay, and that this method underestimated the load of *Legionella* in water samples. Therefore, more specific methods should be used in order to evaluate the real concentrations of pathogenic legionellae in the tilapia farm. Other human pathogenic bacteria did not represent a relevant fraction of the microbial community in the studied samples. Therefore, they do not seem to represent a risk for humans through food contamination. Similarly, the main pathogenic bacteria described for tilapia (Newaj-Fyzul et al., 2008; Pech et al., 2017) also had very low relative abundances or were not detected, suggesting that the studied environments are not relevant reservoirs of fish pathogens.

In the present study, the predominant OTUs from the larval rearing tank and pre-fattening tank samples belonged to *Cetobacterium* (mainly *C. somerae*), presumably originated from the fish feces. *C. somerae* is a vancomycin-resistant, microaerotolerant anaerobe that produces acetate as main metabolic end-product (Finegold et al., 2003). *C. somerae* was first isolated from stools of children with late-onset autism undergoing treatment with vancomycin and also from the feces of a 47-month old male child during the first course of oral treatment with vancomycin (Finegold et al., 2003). However, it has not yet been clarified whether *C. somerae* is indigenous to the intestinal tract and feces of human children, particularly patients being treated with vancomycin (Finegold et al., 2003; Tsuchiya et al., 2008). Its vancomycin resistance seems to be intrinsic, and no mobile genetic elements associated with this trait have been described to date in the bacterium. *C. somerae* has also been isolated as a vitamin B₁₂ producing bacterium from the intestine of freshwater fish such as common carp (*Cyprinus carpio*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Tsuchiya et al., 2008). One study carried out by high-throughput sequencing reported that *Cetobacterium* was part of the microbiota of freshwater fish, mainly from carnivorous, omnivorous and filter-feeding species (Liu et al., 2016). The fact that other bacteria also described as relevant in tilapia feces were not detected in the present study, or had a very low relative abundance would suggest a low capacity for binding to and surviving on wet surface-air interfaces. There are no previous studies on the biofilm-forming capacity of *Cetobacterium*, but this strain may be important for survival of the bacterium in microaerophilic environments outside of the host.

In the present study, uncultured cyanobacteria were the predominant group in one sample from the tank wall (where a green patch of biomass could be seen by the naked eye) and also had high relative

abundances in samples from the floor by the fattening tank and in the fattening tank aerator. Cyanobacteria have been detected in the bacterioplankton communities of tilapia ponds (Fan et al., 2016) and also from the intestinal microbiota of tilapia (Standen et al., 2015). Cyanobacteria may produce an array of cyanotoxins (reviewed by Buratti et al., 2017). Ingestion of cyanotoxins may cause severe poisoning of humans, animals and livestock (Buratti et al., 2017). High concentrations of cyanotoxins in freshwater primarily result from surface scum formation. However, cyanotoxins may accumulate in fish via direct feeding on phytoplankton, through uptake of dissolved toxins after lysis of blooms via epithelial absorption, or from exposure through the food web (Galvão et al., 2009). Accumulation of cyanotoxins by freshwater tilapia has been reported in previous studies (Deblois et al., 2008; Galvão et al., 2009). The potential for production of cyanotoxins among cyanobacteria from the present study is difficult to evaluate, since most of the OTUs belonged to uncultured cyanobacteria and the OTUs from toxic cyanobacteria detected (*Planktothrix*, *Phormidium*, *Aphanizomenon* and *Anabaena*) had low relative abundances (from 1.05% to 2.60% in some samples). Repeated/chronic exposure to low cyanotoxin levels remains a critical issue (Buratti et al., 2017). Considering that cyanobacteria are present in tilapia farms and taking into account that tilapia can accumulate cyanotoxins, periodic inspection of cyanotoxins in tilapia for human consumption is recommended as a safety measure.

5. Conclusions

Results from the study suggest that *Acinetobacter* and cyanobacteria are the main bacterial groups that may potentially pose health risks to humans in the tilapia farm. Monitoring of cyanotoxin production and a more detailed study of the virulence potential of acinetobacters (virulence factors, antibiotic resistance) is recommended for further studies, as well as more detailed studies on the possible seasonal variations of prevalence of these bacterial groups in tilapia farms.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Jaén (Research Structure AGR230). We also acknowledge the Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3.

References

- Antunes, L.C.S., Visca, P., Towner, K.J., 2014. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71, 292–301.
- Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 91 (3), 1049–1130.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (1), 4516–4522.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418), 1318–1322.
- Deblois, C.P., Aranda-Rodriguez, R., Giani, A., Bird, D.F., 2008. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicol.* 51 (3), 435–448.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Fan, L.M., Barry, K., Hu, G.D., Meng, S., Song, C., Wu, W., Chen, J.Z., Xu, P., 2016. Bacterioplankton community analysis in tilapia ponds by Illumina high-throughput sequencing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32 (1), 10.
- FAO, 2014. Fishery statistical collections. (<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>).
- FAO, 2017. National Aquaculture Sector Overview. Spain. (http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_spain/en).
- Finegold, S.M., Vaisanen, M.-L., Molitoris, D.R., Tomzynski, T.J., Song, Y., Liu, C., Collins, M.D., Lawson, P.A., 2003. *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces

- and emended description of the genus *Cetobacterium*. Syst. Appl. Microbiol. 26 (2), 177–181.
- Galvão, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira, Mdo, C., Selma Gouv?a-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., Kujbida, P., 2009. Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. Toxicon 54 (6), 891–894.
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., Verdegem, M., 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. Sci. Rep. 5, 18206.
- Joly-Guillou M.-L. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter* Clin. Microbiol. Infect. 11 868–873
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucl. Acids Res. 41, e1.
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W., 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. Sci. Rep. 6, 24340.
- Newaj-Fyzul, A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Adesiyun, A., 2008. Prevalence of bacterial pathogens and their anti-microbial resistance in tilapia and their pond water in Trinidad. Zoon. Publ. Health 55 (4), 206–213.
- Pakingking Jr., R., Palma, P., Usero, R., 2015. Quantitative and qualitative analyses of the bacterial microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in earthen ponds in the Philippines. World J. Microbiol. Biotechnol. 31 (2), 265–275.
- Pech, Z.G.H., Chavez, C.M.R., Reynoso, F.L., 2017. Pathogenic bacteria in *Oreochromis niloticus* var. Stirling tilapia culture. Fish. Aqua. J. 8, 197.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21, 538–582.
- Pereira, R.P.A., Peplies, J., Brettar, I., Höfle, M.G., 2017. Development of a genus-specific next generation sequencing approach for sensitive and quantitative determination of the *Legionella* microbiome in freshwater systems. BMC Microbiol. 17, 79.
- Rafael, D., 2008. Tilapia farming: a global review (1924–2004). Asia Life Sci. 17, 207–229.
- Romero, J.L., Grande Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R., 2017. Resistance to antibiotics, biocides, preservatives and metals in bacteria isolated from seafoods: co-selection of strains resistant or tolerant to different classes of compounds. Front Microbiol. 8, 1650.
- Standen, B.T., Rodiles, A., Peggs, D.L., Davies, S.J., Santos, G.A., Merrifield, D.L., 2015. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99 (20), 8403–8417.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Res. Int. 45, 502–531.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., Actis, L.A., 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology 149, 3473–3484.
- Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H., 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. Lett. Appl. Microbiol. 46 (1), 43–48.
- Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B., 2017. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. Clin. Microbiol. Rev. 30 (1), 409–447.
- Yoon, E., Goussard, S., Touchon, M., Krizova, L., Cerqueira, G., Murphy, C., Lambert, T., Grillo-Courvalin, C., Nemec, A., Courvalin, P., 2014. Origin in *Acinetobacter guillouiae* and dissemination of the aminoglycoside-modifying enzyme Aph(3 =)-VI. mBio 5 (5), (e01972-14).

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de esta tesis muestran la presencia de bacterias resistentes a biocidas en las diferentes muestras de pescado ensayadas. El 64% de las cepas aisladas en el estudio preliminar para buscar cepas resistentes a biocidas eran bacterias Gram-negativas. Según estudios anteriores, las bacterias Gram-negativas son generalmente más tolerantes que las bacterias Gram-positivas a los agentes antibacterianos (Russell and Gould, 1988; Russell and Chopra, 1990), datos que concuerdan con nuestros resultados donde la mayor resistencia a biocidas se produjo en las bacterias Gram-negativas. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas actúa como una barrera responsable de la resistencia intrínseca de estos microorganismos para muchos compuestos antimicrobianos (Nikaido y Vaara, 1985; Gilbert et al., 1990). Tal resistencia mediada por una baja permeabilidad depende en gran medida no sólo del agente en cuestión, sino también del tipo de microorganismo. La membrana externa de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (y otras bacterias Gram-negativas, en particular *Pseudomonas aeruginosa*) actúa como una barrera que limita o impide la entrada de muchos agentes antibacterianos (Nikaido y Vaara, 1985; Gilbert et al., 1990).

En los resultados obtenidos en el estudio preliminar, un 8,20%, de las cepas aisladas eran resistentes a la concentración de 0,25% de triclosán (TRI). Cuando se amplió el estudio, se encontró que hasta un 16% de los aislados Gram-negativos eran resistentes a este biocida. El triclosan (5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi) fenol) es una biocida ampliamente utilizado en jabones de tocador, pasta de dientes, jabones líquidos, plásticos de uso doméstico, desodorantes, telas, champús, una gran variedad de productos de cuidado personal y productos comerciales para limpieza de superficies, así como incorporado en materiales como tablas de cortar, o embalajes. Tiene un amplio espectro frente a muchos microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas, micobacterias y algunos hongos (Seleh et al., 2010). Las bacterias resistentes a triclosan son abundantes en la naturaleza, y existen muchos mecanismos de resistencia conocidos (Yazdankhah et al., 2006, McMurry et al., 1999, Russell, 2004; McMurry et al., 1998). Recientemente se han descrito genes de resistencia en *Escherichia coli* (Yu et al., 2010). *P. aeruginosa* (Chuanchuen et al., 2001), *Salmonella enterica* serovar typhimurium (Bailey et al., 2008), *Staphylococcus*

aureus (Sorum et al., 2003), *Mycobacterium smegmatis* (McMurry et al., 1999), o *Acinetobacter baumannii* (Chen et al., 2009).

Aparte del triclosan, en el estudio preliminar se detectó también un bajo porcentaje de cepas con altos niveles de resistencia a oxonia, cloruro de benzalconio y hexadecilpiridinio. Atendiendo a la literatura científica, dentro de las bacterias Gram-negativas que son particularmente resistentes a varios biocidas destacan *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *Proteus* spp. y *Providencia stuartii* (Russell y Gould, 1988). *P. aeruginosa* tolera altos niveles de derivados del amonio cuaternario y es también menos susceptible que otros muchos tipos de bacterias Gram-negativas a diacetato de clorhexidina. Aparte de en los alimentos, otros estudios han detectado la presencia de cepas de *Listeria monocytogenes* y *E. coli* resistentes al uso prolongado de derivados de amonio cuaternario en una planta de procesamiento de pescado noruego (Holah et al., 2002). En los mataderos de cabra y cordero, se han detectado también especies de *Pseudomonas* resistentes a antibióticos y biocidas, aisladas de todas las superficies de producción de la cadena de la carne así como en los productos cárnicos (Lavilla et al., 2013).

En la industria alimentaria moderna, la escala de la producción de alimentos aliada a las demandas de los consumidores de alimentos sanos, nutritivos, y mínimamente procesados carentes de aditivos, tales como conservantes químicos y otros agentes antimicrobianos, ha tenido un impacto importante en el número de biocidas utilizados en este entorno. En un intento de mejorar las medidas de higiene y garantizar la seguridad alimentaria, la industria alimentaria ha aumentado la utilización de biocidas y desinfectantes basados en productos químicos para el control de la microbiota presente en el entorno de producción (Langsrud et al., 2003), incrementándose la tolerancia bacteriana a la mayoría de los agentes. Una exposición mayor a los biocidas puede dar lugar a bacterias resistentes que pueden ser transmitidas por los alimentos, lo que puede tener implicaciones importantes para la salud pública. Esta característica, sin duda, pone en peligro el papel de los desinfectantes como un medio eficaz para controlar microorganismos. La tolerancia adquirida a estos agentes podría facilitar la supervivencia de microorganismos patógenos y contribuir a la aparición de cepas resistentes.

Los datos obtenidos en este estudio indican la presencia de cepas resistentes a algunos de los biocidas utilizados en la industria alimentaria, siendo mayor en los pescados en rodajas y en trozos como salmón, merluza y tintorera, donde el contacto con superficies y la manipulación son mayores. Debido a que no existen muchos datos sobre la resistencia de antimicrobianos en cepas procedentes de pescado, sería conveniente profundizar en este tipo de estudios, con el fin de poder conocer mejor los riesgos de selección de cepas resistentes y adoptar medidas de higiene que permitan producir alimentos de mayor calidad y seguridad alimentaria, así como aumentar la vida útil de productos altamente perecederos como el pescado.

Una vez evaluados los resultados preliminares expuestos anteriormente, se ha profundizado en el estudio ampliando la colección de cepas y determinando la tolerancia a biocidas y la resistencia a antibióticos en la colección final de aislados de pescado. Los biocidas se utilizan para muchos propósitos diferentes, incluyendo productos para el cuidado de la salud y procesos de desinfección en la industria alimentaria. Por ejemplo, el cloruro de benzalconio se utiliza para desinfección, tratamiento del agua, eliminación de parásitos en peces y prevención de enfermedades infecciosas tanto en peces como en marisco. Como resultado, grandes cantidades de biocidas llegan a las aguas. Se ha descrito el impacto del triclosán sobre las comunidades de bacterias acuáticas (Dann y Hontela, 2011; McNamara et al., 2014). El contacto previo con biocidas, así como la resistencia natural adquirida, podría explicar las tolerancias a biocidas observadas en las cepas bacterianas analizadas en el presente estudio. También vale la pena señalar que hubo correlaciones positivas no sólo para la tolerancia a los biocidas del mismo grupo químico, sino también entre biocidas de diferentes grupos. Sin embargo, hubo diferencias entre las poliguaninas, ya que el hidrocloreuro (hexametilén guanidinio) mostró una correlación positiva con varios biocidas, mientras que no fue así en la clorhexidina. Estos resultados podrían explicarse por las diferencias existentes en la fórmula química, los mecanismos de adaptación (incluida la resistencia intrínseca) y también por el desarrollo de mecanismos específicos de tolerancia tras la exposición a múltiples biocidas. Un porcentaje relativamente alto de aislamientos fueron resistentes al menos a un biocida y al menos a un antibiótico y hubo correlaciones significativas ($P < 0,05$) positivas entre la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos. Estos resultados refuerzan la preocupación general de que el uso de biocidas pueda co-seleccionar para la resistencia

a los antibióticos (SCENIHR, 2009; Ortega-Morente et al., 2013; Wales y Davies, 2015). Se ha descrito resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas y también entre diferentes biocidas para diferentes bacterias, como por ejemplo *P. aeruginosa* (Lambert et al., 2001; Lavilla Lerma et al., 2015). Además, estudios previos han demostrado que la adaptación a biocidas por exposición repetida da como resultado una mayor resistencia a los antibióticos (Gadea et al., 2016, 2017a).

Cabe señalar también, que hubo algunas correlaciones positivas entre tolerancia/resistencia a biocidas, antibióticos y a otros antimicrobianos. Por ejemplo, frente al triclosan se observó una correlación positiva con menor sensibilidad que al timol (pero no fue así con el carvacrol), y el antibiótico ampicilina también mostró correlación positiva con el timol. Estudios anteriores han demostrado que la exposición a aceites esenciales de plantas (que son ricos en compuestos fenólicos), tales como aceite de pino provocaba la selección de mutantes para el operón *mar* disminuyendo la susceptibilidad a una gama de compuestos antimicrobianos (incluyendo antibióticos y biocidas) como consecuencia de la reducción de la permeabilidad de las células y el aumento de la actividad de la bomba de exporte (Moken et al., 1997; Ortega-Morente et al., 2013). Cabe destacar que los conservantes químicos como el lactato sódico y fosfato trisódico empleados en este estudio sólo mostraron correlaciones positivas moderadas con los antibióticos como la ampicilina e imipenem, pero no con biocidas. Un estudio reciente indicó que las bacterias adaptadas a los compuestos de amonio cuaternario como el triclosán en condiciones de laboratorio mostraban de forma generalizada una tolerancia aumentada a los conservantes (como el ácido 4-hidroxibenzoico, el tomillo y el aceite de clavo, los nitratos de sodio y de potasio y el sorbato de potasio) (Gadea et al., 2017b).

Las sulfonamidas potenciadas con trimetoprim o ormetoprima y el florfenicol son algunos de los antibióticos utilizados comúnmente en la acuicultura (Hernández Serrano, 2005). En el presente estudio, el gen *sul1* de resistencia a las sulfonamidas fue el determinante genético detectado con mayor frecuencia. La resistencia a la sulfonamida está ligada a los integrones de Clase I. Estos elementos genéticos móviles tienden a acumular diferentes genes de resistencia a los antibióticos y también genes de tolerancia a los biocidas como *qacEΔ1*. Sin embargo, *qacEΔ1* se detectó en combinación con *sul1* sólo en los aislados de *A. calcoaceticus*, y la ausencia de

amplificación por PCR al emplear un cebador directo para *qacEΔ1* y un cebador inverso para *sul1* no sugieren una ubicación física cercana de los dos genes a menos que estuvieran en dirección opuesta. Los integrones de resistencia de clase I están situados en elementos móviles como transposones y plásmidos y se distribuyen ampliamente entre cepas clínicas y también en aislados del medio ambiente, jugando un papel importante como reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos (L'Abée-Lund y Sørum, 2001; Stokes y Gillings, 2011; Koczura et al., 2013, 2014). Un estudio realizado en instalaciones de acuicultura en el norte del Mar Báltico (Finlandia) detectó que los genes de resistencia a los antibióticos para sulfonamidas (*sul1* y *sul2*) y trimetoprim (*dfrA1*) y un gen para la integrasa de clase 1 (*intI1*) persistían en sedimentos de las granjas de peces a concentraciones antibióticas muy bajas durante un período de observación de 6 años (Muziasari et al., 2014). Presumiblemente, los genes de resistencia a los antimicrobianos podrían propagarse a otras bacterias en sedimentos marinos colonizando peces que no son de acuicultura y de éstos a ambientes de procesamiento de pescados. Esto podría explicar el hallazgo de *sul1* en bacterias aisladas en el presente estudio a partir de peces como sardinas, anchoas, jurel, lubina, dorada, salmón y calamar. Además, en un número de casos, los aislamientos bacterianos que llevaban *sul1* también resultaron positivos para el gen de resistencia al florfenicol *floR*, que también puede estar asociado con integrones de Clase I (Toleman et al., 2007; Lin et al., 2016).

La acuicultura depende en gran medida del uso de antibióticos (Hernández Serrano, 2005), y varios estudios han informado sobre la resistencia a los antimicrobianos en bacterias de los ecosistemas acuícolas (Shah et al., 2014; Huang et al., 2015; Xiong et al., 2015; Watts et al., 2017). Uno de los aislados procedente de gambas cultivadas en acuicultura, identificado como *Acinetobacter oleivorans*, mostró un espectro de resistencias más amplio que el resto. Fue resistente a 10 antimicrobianos y resultó positivo para los determinantes genéticos *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}. Dado que las gambas fueron hervidas y congeladas y luego se vendieron sin congelar sobre el mostrador en hielo, existe la posibilidad de que esta cepa llegase a la comida por contaminación cruzada durante el manejo. Las gambas hervidas son un alimento listo para comer, por lo tanto, las bacterias con múltiples resistencias a los antibióticos junto con sus genes de resistencia a los antibióticos podrían pasar de este alimento a los humanos.

Acinetobacter incluye un grupo de bacterias que crecen en suelo y agua, además de ser patógenos oportunistas para los seres humanos. Se sabe que las cepas patógenas para humanos presentan resistencia intrínseca y adquirida a una amplia variedad de antimicrobianos (Doughari et al., 2011). También cabe destacar que los *Acinetobacter* detectados en el presente estudio (todos ellos identificados como *A. oleivorans*) de rodajas de salmón crudo, también cultivado en acuicultura, fueron resistentes a un menor número de antibióticos (4 y 6), pero todas dieron positivo para los determinantes genéticos *qacEΔ1*, *sul1* y *aac (6 ')-Ib*, y dos de ellas también fueron positivas para el gen *bla_{TEM}* de la correspondiente β-lactamasa de espectro extendido. *A. oleivorans* se ha descrito como una bacteria aislada de un arrozal capaz de degradar aceite diesel y n-hexadecano (Kang et al., 2011). Hasta ahora, la resistencia a antibióticos de *Acinetobacter* no patógenos ha sido poco estudiada, pero los resultados del presente estudio sugieren que podrían ser un importante reservorio de genes para resistencia a los antimicrobianos.

Entre los resultados obtenidos en el presente estudio cabe destacar que un 14,94% de los 87 aislados eran resistentes a imipenem. Los carbapenémicos fueron de los últimos β-lactámicos universales con actividad frente a Gram-negativos, pero los genes de resistencia a carbapenémicos se están extendiendo, (Nordmann et al., 2011). Además, entre las metalo-β-lactamasas investigadas en el presente estudio, en dos de los aislados (ambos pertenecientes a *Pseudomonas*) se detectaron los genes para la imipenemasa (*bla_{IMP}*) y el gen de la metalo-β-lactamasa NDM-1 de Nueva Delhi (*bla_{NDM-1}*). En patógenos Gram-negativos se han detectado varias metalo-β-lactamasas codificadas por ADN móvil (Cornaglia et al., 2011). La metalo-β-lactamasa NDM-1 ha sido descrita principalmente en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, aunque también se ha encontrado en una gran variedad de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. y *Vibrio cholerae* (Poirel et al., 2011; Walsh et al., 2011; Mataseje et al., 2016). En *P. aeruginosa*, se ha descrito que el gen cromosómico *bla_{NDM-1}*; se encuentra dentro de un integrón de clase 1 que tiene una región común (*ISCR1*) en una estructura de tipo Tn402 (Jovcic et al., 2013; Janvier et al., 2013). Sorprendentemente, el integrón también contenía el determinante de resistencia a QACs *qacEΔ1* y el *sul1* de resistencia a la sulfonamida. Se ha descrito una agrupación de genes similar para las regiones *bla_{NDM-1}* del plásmido transferible de *E.*

coli pNDM15-1078 (Mataseje et al., 2016). Además, *bla*_{NDM-1} aparece con frecuencia en asociación con *ble*_{MBL}, el cual confiere resistencia a la bleomicina, un antibiótico glicopeptídico producido en la naturaleza por *Streptomyces verticillus*. Es posible que las moléculas de tipo bleomicina contribuyan a la presión selectiva, lo que conduce a una mayor propagación de los productores de NDM en el medio ambiente (Mataseje et al., 2016).

Todos los aislados de *Aeromonas* del presente estudio eran resistentes a clorhexidina, ampicilina e imipenem. Además, dos de ellos dieron positivo para *sul1* y *bla*_{TEM} y uno también fue positivo para *bla*_{CTX-M}. *Aeromonas* están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos (Holmes et al., 1996). El género incluye especies patógenas para peces y humanos (como *A. salmonicida* y otros). En un estudio sobre aislamientos resistentes a ampicilina de aguas de estuario, Henriques et al. (2006) detectaron la presencia del gen de la integrasa (junto con otros genes asociados con integrones de Clase I) en cepas de *Aeromonas*. También se detectó la presencia de genes de β -lactamasas *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CphA} y *bla*_{OXA-B} en las cepas de *Aeromonas*. Sorprendentemente, el *bla*_{OXA-B} detectado en *Aeromonas* sp. y *A. hydrophila* se asoció con integrones de clase I. Otro estudio sobre *Aeromonas* aislado de nueve granjas de truchas de agua dulce en Australia informó sobre la presencia de *sul1* junto con otros genes de resistencia a antibióticos típicamente asociados con integrones de clase I (Ndi y Barton, 2011). Sin embargo, no se detectaron los genes de β -lactamasas investigados (*bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}). De acuerdo con los resultados obtenidos y los descritos por otros autores, sería interesante llevar a cabo estudios adicionales con el fin de determinar la posible asociación entre los genes de β -lactamasas detectados en los aislados de *Aeromonas* del presente estudio con los integrones de clase I.

En el presente estudio, se encontró un aislado resistente a la cefotaxima, ceftazidima, estreptomina y ácido nalidíxico, que fue identificado como *Listeria innocua*. Este aislamiento resultó positivo para el gen de resistencia β -lactamasa *bla*_{PSE}. En el estudio realizado por Jamali y colaboradores sobre resistencia a antimicrobianos en cepas de *Listeria* spp. aisladas de pescado crudo y pescado comercializado al aire libre en el mercado (Jamali et al., 2015), los autores detectaron una alta resistencia de *L. monocytogenes* a la tetraciclina y a la penicilina G. Dichos resultados concordaban también con los obtenidos en otros estudios previos (Rodas-Suárez et al., 2006; Fallah et al., 2013). Otro trabajo mostró un alto nivel de resistencia a la ampicilina, cefotaxima

(100%), penicilina (57%) en aislados de *L. monocytogenes* (Abdollahzadeh et al., 2016). Podríamos especular que la cepa de *L. innocua* aislada de calamar en el presente estudio procede de la contaminación cruzada durante la manipulación y procesamiento del alimento. Aunque se trata de una especie no patógena, los resultados sugieren que las diferentes especies de *Listeria* presentes en los entornos de procesamiento de productos del mar pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a los antimicrobianos. La exposición a concentraciones bajas de antibióticos, desinfectantes, contaminantes químicos y metales puede actuar como presión selectiva y favorecer el desarrollo y la prevalencia de resistencias entre poblaciones bacterianas autóctonas de los sistemas alimentarios (Martínez, 2009).

Existe la preocupación de que la exposición a los metales pueda co-seleccionar la resistencia a antibióticos. En el presente estudio, entre los aislados capaces de crecer a altas concentraciones de sulfato de cobre y cloruro de zinc se encontraban representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Proteus*. La tolerancia al metal observada podría deberse a la exposición directa a estos metales en el medio ambiente. Además, el gen para la oxidasa multicobre *pcoA/copA* se detectó en varias cepas de *Pseudomonas* que además llevaban genes de resistencia a antibióticos (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{PSE}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *aadA1*, *aac(6')-Ib*, *sul1*, *sul2*, *floR*). El sistema inducible por cobre *copABCDRS* se describió por primera vez en el plásmido pPT23D de *P. syringae* (Cha y Cooksey, 1991) y es homólogo al sistema *pco* encontrado en el plásmido conjugativo pRJ1004 de *E. coli*. Además del sistema plasmídico, las ATPasas cromosómicas de tipo P son responsables de conferir tolerancia a metales como cobre, zinc, cobalto, cromo y cadmio (Teitzel y Parsek, 2003).

Según lo indicado por Berendonk et al. (2015), las presiones selectivas presentes en entornos naturales como ríos y lagos como resultado de prácticas humanas están llevando a la aparición de un creciente número de aislados de *Pseudomonas* resistentes a múltiples fármacos (Berendonk et al., 2015). Sin embargo, en el estudio de la resistencia de *P. aeruginosa* E67, aislada de un estuario contaminado por metales, no se encontró relación física entre los determinantes de resistencia a metales y a antibióticos, lo que sugiere un predominio de resistencia múltiple cruzada asociada con bombas de exporte (Teixeira et al., 2016). Las bombas de exporte descritas en bacterias pueden

utilizar una gran variedad de antimicrobianos, incluyendo colorantes, antibióticos y biocidas (Poole, 2007). No obstante, sería interesante realizar estudios más detallados para determinar si existe alguna asociación de los genes *pcoA/copA* plasmídicos con los genes de resistencia a antibióticos en *Pseudomonas*.

En conclusión, los resultados del presente estudio indican claramente que las bacterias presentes en pescado llevan genes resistencia a diferentes antimicrobianos. El posible papel de estas bacterias en la propagación de la resistencia a los antimicrobianos a través de la cadena alimentaria necesita ser más investigado. También es importante encontrar formas alternativas de manejar la resistencia antimicrobiana. Los métodos biológicos como el uso de probióticos (Tan et al., 2016; Banerjee y Ray, 2017) o la aplicación de bacteriófagos (Letchumanan et al., 2016; Torres-Barceló et al., 2016; Parmar et al., 2017) podrían ser unas alternativas prometedoras al uso de los antimicrobianos clásicos.

La piscicultura es una práctica cada vez más frecuente, y muy interesante como medio para proporcionar una fuente de proteína asequible para la población. Sin embargo, la piscicultura puede generar ambientes en los que proliferen las bacterias toxinógenas o patógenas. Así, como continuación del estudio previo sobre resistencias a antimicrobianos en cepas aisladas de pescado, nos propusimos conocer la biodiversidad microbiana en una piscifactoría, y en especial en aquellos ambientes que pueden actuar como reservorios y a la vez facilitar la dispersión de los microorganismos. En este sentido, las superficies mojadas que están en contacto con el aire merecen especial atención, ya que pueden comportarse como reservorios de bacterias facilitando así la propagación de microorganismos. Los resultados del presente estudio mostraron que algunas cepas de *Acinetobacter* (principalmente *A. calcoaceticus/baumannii*) predominaban por lo menos en dos muestras de la granja de tilapia (muestras tomadas del aireador del tanque de engorde y del sifón). La mayoría de las especies de *Acinetobacter* son microorganismos ambientales no patógenos; sin embargo, las especies adaptadas a los entornos clínicos están causando graves problemas de salud sobre todo en infecciones nosocomiales (Wong et al., 2017). Particularmente, *A. baumannii* ha sido catalogado como uno de los patógenos nosocomiales más importantes (Joly-Guillouet et al., 2005; Peleg et al., 2008; Antunes et al., 2014). Esta bacteria se adhiere formando biofilms en superficies abióticas, particularmente en las interfases líquido-aire (Tomaras et al., 2003). Estas interfases son importantes para la

diseminación bacteriana a través de aerosoles. Dado los resultados obtenidos, debemos realizar más estudios para evaluar la presencia de *Acinetobacter* en aerosoles y los posibles riesgos de exposición para los trabajadores en las granjas de tilapia.

Otra razón para considerar a los acinetobacters como bacterias preocupantes en la industria del pescado, es la presencia en estos de factores de resistencia a antimicrobianos. Yoon et al. (2014) describieron que el gen *aphA6* codifica una enzima que confiere resistencia a la amicacina, el aminoglucósido más activo para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *Acinetobacter* spp. se diseminó a partir de la especie ambiental *Acinetobacter guillouiae*. Como se ha comentado más arriba, las cepas de *A. calcoaceticus* y *A. oleivorans* aisladas de rodajas de salmón y langostinos vendidos en supermercados presentan múltiples resistencias a los antibióticos (Romero et al., 2017). Además, las cepas de *A. calcoaceticus* llevan el gen *qacEΔ1* de resistencia a derivados de amonio cuaternario y el gen *sul1* de resistencia a la sulfonamida. Por tanto, razón de más para estudiar la resistencia a los antibióticos de *Acinetobacter* en la piscicultura.

Respecto a otras posibles bacterias patógenas para humanos, las OTUs asignadas al género *Legionella* estaban comprendidas entre 0,15 y 0,19% en dos de las muestras, pero el número de lecturas asignadas a *Legionella pneumophila* era demasiado bajo como para llegar a una conclusión sobre el riesgo de exposición a esta bacteria. Un estudio reciente (Pereira et al., 2017) dice que la concentración mínima de *L. pneumophila* detectada con Illumina MiSeq utilizando cebadores universales fue de 10² copias de genoma por ensayo y que además este método subestima la carga de *Legionella* en muestras de agua. Por tanto, se deben utilizar métodos más específicos para evaluar las concentraciones reales de *Legionella* en la granja de tilapia.

Otras bacterias patógenas para humanos no representan una proporción relevante en la microbiota de las muestras estudiadas. Por lo que no parecen representar un riesgo para los humanos en la contaminación alimentaria. De manera similar, las principales bacterias patógenas que se han descrito en la tilapia (Newaj-Fyzul et al., 2008; Pech et al., 2017) también tenían abundancias relativas muy bajas o no detectables, lo que sugiere que los ambientes estudiados no son realmente reservorios relevantes de estos patógenos de peces. En el presente estudio, las OTUs predominantes del tanque de cría

de larvas y las muestras del tanque de pre-engorde se identificaron como *Cetobacterium* (principalmente *Cetobacterium somerae*), presumiblemente se originaron a partir de heces de pescado. *C. somerae* es un organismo anaerobio microaerotolerante resistente a la vancomicina que produce acetato como principal producto metabólico final (Finegold et al., 2003). *C. somerae* se aisló por primera vez de heces de niños con autismo de aparición tardía que habían recibido tratamiento con vancomicina y también de las heces de un niño varón de 47 meses durante el primer tratamiento oral con vancomicina (Finegold et al., 2003). Sin embargo, aún no está claro que *C. somerae* sea un patógeno del tracto intestinal y que se encuentre en las heces de los niños, en particular en pacientes tratados con vancomicina (Finegold et al., 2003; Tsuchiya et al., 2008). La resistencia a la vancomicina parece ser algo intrínseco, y hasta la fecha no se han descrito elementos genéticos móviles en esta bacteria asociados a esta característica. También se ha aislado *C. somerae* productora de vitamina B12 a partir del intestino de algunos peces de agua dulce, como carpa común (*Cyprinus carpio*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Tsuchiya et al., 2008). Un estudio llevado a cabo mediante secuenciación masiva describe que *Cetobacterium* forma parte de la microbiota de peces de agua dulce, principalmente de especies carnívoras, omnívoras y filtradoras (Liu et al., 2016). El hecho de que otras bacterias también descritas como relevantes en las heces de tilapia no se detectaran en el presente estudio o presentaran una abundancia relativa muy baja sugiere una baja capacidad para sobrevivir en las interfases húmedas de la superficie y del aire. No existen estudios previos sobre la capacidad de *Cetobacterium* para formar biopelículas, pero este trabajo puede ser importante para estudiar la supervivencia de la bacteria en ambientes microaerófilos fuera del huésped.

En el presente estudio, las cianobacterias no cultivadas fueron el grupo predominante en una muestra de la pared del tanque (donde se podía ver un parche verde de biomasa a simple vista) y también tenían altas abundancias relativas tanto en muestras del suelo del tanque de engorde como en el aireador. Se han detectado cianobacterias en las comunidades de bacterioplancton de estanques de tilapia (Fan et al., 2016) y también en su microbiota intestinal (Standen et al., 2015). Las cianobacterias pueden producir un conjunto de cianotoxinas (revisado por Buratti et al., 2017). La ingestión de cianotoxinas puede causar envenenamiento severo en humanos, animales y ganado (Buratti et al., 2017). Las altas concentraciones de cianotoxinas en

agua dulce resultan principalmente por la formación de afloramientos superficiales. Sin embargo, las cianotoxinas pueden acumularse en los peces a través de la alimentación directa del fitoplancton, a través de la absorción de toxinas disueltas en el agua después de la lisis bacteriana, a través de la absorción epitelial o de la exposición a través de la red alimentaria (Galvão et al., 2009). La acumulación de cianotoxinas en la tilapia de agua dulce ya se ha descrito previamente (Deblois et al., 2008; Galvão et al., 2009). El potencial de producción de cianotoxinas entre las cianobacterias del presente estudio es difícil de evaluar, ya que la mayoría de las OTUs pertenecían a cianobacterias no cultivadas y las OTUs asignadas a cianobacterias potencialmente tóxicas (*Planktothrix*, *Phormidium*, *Aphanizomenon* y *Anabaena*) tenían una baja abundancia relativa (de 1.05% a 2.60% en algunas muestras). Las consecuencias que podría tener una exposición repetida / o crónica a niveles bajos de cianotoxinas están aún por determinar (Buratti et al., 2017). Teniendo en cuenta que las cianobacterias están presentes en las granjas de tilapia y teniendo en cuenta que la tilapia puede acumular cianotoxinas, se recomienda la inspección periódica de cianotoxinas en tilapia para consumo humano como medida de seguridad.

CONCLUSIONES

- 1.-Las bacterias aisladas de productos marinos presentan una baja incidencia de tolerancia a los biocidas ensayados.
- 2.-En cambio, presentan una incidencia elevada de resistencia a antibióticos como ampicilina, cefotaxima, cloranfenicol y trimetoprim/sulfametoxazol y en menor medida también a imipenem y ceftazidima.
- 3.-La mayoría de las cepas tolerantes a biocidas también presentan resistencia a antibióticos.
- 4.-La mayoría de las cepas tolerantes a biocidas y resistentes a antibióticos son especies Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*.
- 5.-Un porcentaje bajo de las cepas estudiadas son multirresistentes tanto para biocidas como para antibióticos.
- 6.-Se han encontrado correlaciones altamente significativas entre tolerancia a determinados biocidas y resistencia a antibióticos.
- 7.-La mayoría de las cepas tolerantes a biocidas muestran también altos niveles de tolerancia a los metales pesados cobre y cinc.
- 8.-Las cepas tolerantes a biocidas presentan genes de resistencia a antibióticos y en menor medida también a biocidas y a metales pesados, indicando la presencia de mecanismos específicos de resistencia.
- 9.-El estudio de biodiversidad bacteriana en una granja de tilapia indica que *Acinetobacter* y *Cyanobacteria* son los principales grupos microbianos con una mayor abundancia relativa y que podrían representar riesgos para la salud.
- 10.-La abundancia relativa de otros potenciales patógenos para humanos así como para peces es baja.

REFERENCIAS

Abaroa, M.C., Pérez-Villarreal, B., Bald, C., Riesco, S., Picaza, N. (2008). Frescura del pescado-guía visual para su evaluación sensorial. AztiTecnalia.

Abdollahzadeh, E., Ojagh, S.M., Hosseini, H., Ghaemi, E.A., Irajian, G., Naghizadeh, H.M. (2016). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microb. Pathog.* 100:70–74.

Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 137:130-136.

Amoroso, M.J., Schubert, D., Mitscherlich, P., Schumann, P., Kothe, E. (2000). Evidence of high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces* sp. *J. Basic Microbiol.* 40:295-301.

An. Q., Wu. Y.Q., Wang, J.H., Li, Z.E. (2010). Assessment of dissolved heavy metal in the Yangtze river estuary and its adjacent sea, China. *Environ. Monit. Assess.* 164:173–187.

Ang, J.Y., Ezike, E., Asmar, B.I. (2004). Antibacterial resistance. *Indian J. Pediat.* 71:229-239.

Ansari, M.I., Grohmann, E., Malik, A. (2008). Conjugative plasmids in multi-resistant bacterial isolates from Indian soil. *J. Appl. Microbiol.* 104:1774–1781.

Antunes, L.C.S., Visca, P., Towner, K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71:292–301.

Ayres, H.M., Furr, J.R., Russell, A.D. (1993). A rapid method of evaluating permeabilizing activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:149-151.

Banerjee, G., Ray, A.K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* 115:66–77.

Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C., Mengoni, A. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb Ecol.* 53(2):306-316.

Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z. (2006). Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food Con.* 17:183-188.

Belem-Costa, A., Cyrino, J.E.P. (2006). Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Sci. Agric.* 63(3):281–284.

Belloso, W. (2009). Revista Hospital Italiano de Buenos Aires (Vol. 29 N° 2, diciembre 2009). *Historia de los antibióticos*.

Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 37:263-268.

Berendonk, T., Manaia, U., Merlin, C.M., Fatta-Kassinos, C., Cytryn, D., Walsh, E. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:310–317.

Bjornsdottir-Butler, K., Green, D.P., Bolton, G.E., McClellan-Green, P.D. (2015). Control of histamine-producing bacteria and histamine formation in fish muscle by trisodium phosphate. *J. Food Sci.* 80(6):M1253-1258.

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Rev. Microbiol.* 13:42-51.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley M. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 277:1453-74.

Braoudaki, M., Hilton, A.C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 42:73–78.

Bui, D.M., Gregan, J., Jarosch, E., Ragnini, A., Schweyen, R.J. (1999). The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 274:20438-20443.

Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 91(3):1049–1130.

Cabello, F., Godfrey H, Buschmann A.H., Dölz H.J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.* 16:127-133.

Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC). (2016). *Surveillance Atlas of Infectious Diseases*. atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx.

Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. (2010). Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “resistance” has different meanings. *Int. J. Food Microbiol.* 136:247–254.

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Lat. Microbiol.* 48(2):203-210.

Cha, J.S., Cooksey, D.A. (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Microbiol.* 88:8915–8919.

Chopra, I. (1982). Plasmids and bacterial resistance. In Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ (eds.). *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd. p. 199-206.

Chopra, I. (1987). Microbial resistance to veterinary disinfectants and antiseptics. In: Linton AH, Hugo WB, Russell AD (eds.). *Disinfection in veterinary and farm animal practice*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd. p. 43-65.

Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:428-432.

Collard, J., Provoost, A., Taghavi, S., Mergeay, M. (1993). A new type of *Alcaligenes eutrophus* CH34 zinc resistance generated by mutations affecting regulation of the cnr cobalt-nickel resistance system. *J. Bacteriol.* 175:779-784.

Cornaglia, G., Giamarellou, H., Rossolini, G.M. (2011). Metallo- b- lactamases: a last frontier for b-lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11:381–393.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* 284:1318–1322.

Cox, A.D., Wilkinson, S.G. (1991). Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* 5: 641-646.

Crémet, L., Caroff, N., Dauvergne, S., Reynaud, A., Lepelletier, D., Corvec, S. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathol. Biol.* 59:151–156.

Dann, A.B., Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31:285–311.

de Toro, M., Sáenz, Y., Cercenado, E., Rojo-Bezares, B., García-Campello, M., Undabeitia, E., Torres, C. (2011). Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *Int. Microbiol.* 14:173-181.

Deblois, C.P., Aranda-Rodriguez, R., Giani, A., Bird, D.F. (2008). Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon* 51:435–448.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167–193.

DOUE, 2003. Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE L 268). (18.10.2003). *Reglamento CE N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre aditivos en la alimentación animal.*

DOUE, 2013. Diario Oficial de la Unión Europea (Decisión de ejecución de la Comisión 2013/652/UE). L 303/26 de 14-11-2013. *Decisión de ejecución de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos.*

Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp: an overview. *Microb. Environ.* 26:101–112.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2012. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2013. Epidemiological update: multistate outbreak of *Salmonella* Stanley infection, 30 January 2013. Published 7 Feb 2013.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 11:3129, 250 pp.

Ertas, O.N., Guler, T., Ciftci, M., Dalkilic, B., Simsek, U.G. (2005). The effect of an essential oil mix derived from Oregano, Clove and Anise on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.* 4:879-884.

Fallah, A.A., Saei-Dehkordi, S.S., Mahzounieh, M. (2013). Occurrence and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. *Food Cont.* 34:630–636.

Fan, L.M., Barry, K., Hu, G.D., Meng, S., Song, C., Wu, W., Chen, J.Z., Xu, P., (2016). Bacterioplankton community analysis in tilapia ponds by Illumina high-throughput sequencing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32:10.

- FAO, 2013. El estado mundial de la agricultura y la alimentación
- FAO, 2014. Fishery statistical collections. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>.
- FAO, 2016. 2014/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura. 2104. Roma, Italia.
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO, 2017. National Aquaculture Sector Overview. Spain. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_spain/en
- Finegold, S.M., Vaisanen, M.L., Molitoris, D.R., Tomzynski, T.J., Song, Y., Liu, C., Collins, M.D., Lawson, P.A. (2003). *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:177–181.
- Forsythe, F., Hayes, P.R. (1999). Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP 2007. 2ª edición. S.J.. Ed. Acribia, S.A.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:722-732.
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M.A., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E. (2016). Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Res. Int.* 85: 131–143.
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M.A., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E. (2017a). Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiol.* 63:58–71.
- Gadea, R., Glibota, N., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E. (2017b). Effects of exposure to biocides on susceptibility to essential oils and chemical preservatives in bacteria from organic foods. *Food Cont.* 80:176–182.

Galvão, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira, Mdo, C., Selma Gouva-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., Kujbida, P. (2009). Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. *Toxicon* 54:891–894.

Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M., Wellington, M.H. (2005). Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49:1802-1807.

Gerba, C.P. (2015). Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:464-469.

Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., Verdegem, M. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci. Rep.* 5:18206.

Gilbert, P. (1998). Microbial resistance to preservative systems. In Bloomfield SF, Baird R, Leak RE, Leech R. *Microbial quality assurance in pharmaceuticals, cosmetics and toiletries*. Chichester: Ellis Horwood; p. 171-194.

Gilbert, P., McBain, A.J. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:189–208.

Gilbert, P., Moore, L.E. (2005). Cationic antiseptic: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 99: 703-715.

Goddard, P.A., McCue, K.A. (2001). Phenolic compounds. In *Disinfection, sterilization and preservation*; S.S. Block (Ed.); Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia (USA).

Gómez-Sanz, E., Kadlec, K., Feßler, A. T., Zarazaga, M., Torres, C., Schwarz S. (2013). Novel *erm*(T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3275-3282.

Gram, L., Huss, H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products *Int. J. Food Microbiol.* 33:121-137.

Gu, Y.G., Lin, Q., Wang, X.H., Du, F.Y., Yu, Z.L., Huang, H.H. (2015a). Heavy metal concentrations in wild fishes captured from the South China Sea and associated health risks. *Mar. Pollut. Bull.* 96:508–512.

Gu, Y.G., Lin, Q., Yu, Z.L., Wang, X.N., Ke, C.L., Ning, J.J. (2015b). Speciation and risk of heavy metals in sediments and human health implications of heavy metals in edible nekton in Beibu Gulf, China: a case study of Qinzhou Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 101:852–859.

Gu, Y.G., Huang, H.H., Lin, Q. (2016). Concentrations and human health implications of heavy metals in wild aquatic organisms captured from the core area of Daya Bay's fishery resource reserve, South China Sea. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45:90–94.

Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *Int. J. Mol. Sci.* 13:1541–1560.

Hammond, S.M., Lambert, P.A., Rycroft, A.N. (1984). *The bacterial cell surface*. London: Croom Helm

Hancock, R.E. (1984). Alterations in membrane permeability. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:237-264.

Hansen, L.S., Jensen, L.B., Sørensen, H.I. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:145–147.

Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and b-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* 157:938–947.

Hernández Serrano, P. (2005). Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 469, FAO, Rome.

Herrera-León, S., González-Sanz, R., Herrera-León, L., Echeita, M.A. (2011). Characterization of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:287–290.

Hobman, J. L., Crossman, L.C. (2014). Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* 64:471–497.

Holmes, P., Nicholls, L.M., Sartory, D.P. (1996). The ecology of mesophilic *aeromonas* in the aquatic environment, in *The Genus Aeromonas*, eds B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling, and S. Joseph (New York, NY: John Wiley and Sons), 127–150.

Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 31:24– 28.

Hopkins, K.L., Day, M., Threlfall, E.J. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 14:340–342.

Huang, Y., Zhang, L., Tiu, L., Wang, H.H. (2015). Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front. Microbiol.* 6:914.

Hugo, W.B., Russell, A.D. (1999). Types of antimicrobial agents. In *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3a ed. Oxford: Blackwell Science. p. 5-94.

İbrahim, S.M., Nassar, A.G., El-Badry, N. (2008). Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging methods on some quality aspects of smoked mullet (*Mugil cephalus*). *Global Vet.* 2:296-300.

Iovleva, A., Doi, Y. (2017). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin. Lab. Med.* 37:303-315.

Iruka, N.O., Ramanan, L., Zulqar, A.B., Adriano, G.D., Philip, J., Thomas, F.O. (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet* 5:481-493.

Jamali, H., Paydar, M., Ismail, S., Looi, C.Y., Wong, W.F., Radmehr, B., Abedini, A. (2015). Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. *BMC Microbiol.* 15:144.

Janvier, F., Jeannot, K., Tesse, S., Robert-Nicoud, M., Delacour, H., Rapp, C., Mérens, A. (2013). Molecular characterization of blaNDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3408–3411.

Joly-Guillou M.L. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter Clin. Microbiol. Infect.* 11:868–873.

Jovcic, B., Lepsanovic, Z., Begovic, J., Rakonjac, B., Perovanovic, J., Topisirovic, L., Kojić, M. (2013). The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the blaNDM-1 gene in a novel genetic context. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3405–3407.

Kang, C.H., Shin, Y., Kim, W., Kim, Y., Song, K., Oh, E.G., Kim, S., Yu, H., So, J.S. (2015). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23:918-926.

Kang, Y. S., Jung, J., Jeon, C.O., Park, W. (2011). *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J. Microbiol.* 49:29–34.

Kapil, A. (2005). The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian J. Med. Res.* 121: 83-91.

Kim, Y.T., Jang, J.H., Kim, H.C., Kim, H., Lee, K.R., Park, K.S., Lee, H.J., Kim, Y.J. (2011). Identification of strain harboring both *aac(6')-Ib* and *aac(6')-Ib-cr* variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*. *BMB Rep.* 44: 262–266.

Koczura, R., Mokracka, J., Barczak, A., Krysiak, N., Kubek, M., Kaznowski, A. (2013). Association between the presence of class 1 integrons virulence genes and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microb. Ecol.* 65:84–90.

Koczura, R., Semkowska, A., Mokracka, J. (2014). Integron-bearing Gram-negative bacteria in lake waters. *Lett. Appl. Microbiol.* 59:514–519.

Kücken, D., Feucht, H.H., Kaulfers, P.M. (2000). Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183:95–98.

L'Abée-Lund, T.M., Sørum, H. (2001). Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microbial Drug Res.* 7:263–272.

Labbé, R., Rahmati, T. (2012). Growth of enterotoxigenic *Bacillus cereus* on salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Food Prot.* 75:1153-1156.

Leclercq, R., Courvalin, P. (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1267-1272.

Leite de Souza, E., De Oliveira, E., De Luna, K.R., Paiva, C. (2005). Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48:245-250.

Leite de Souza, E., Montenegro, T.L., De Oliveira, E. (2006). Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. *Braz. J. Microbiol.* 37(4):151-157.

Letchumanan, V., Chan, K.G., Pusparajah, P., Saokaew, S., Duangjai, A., Goh, B.H., Mutalib, N.S., Lee, L.H. (2016). Insights into bacteriophage application in controlling *Vibrio* species. *Front. Microbiol.* 7:1114.

Leveau, 2002. Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección.

Levy, S.B. (1998). The challenge by antibiotic resistance. *Sci. Am.* 278: 46-53.

Levy, S.B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Med.* 10:122-129.

Lin, M., Wu, X., Yan, Q., Ma, Y., Huang, L., Qin, Y., Xu, X. (2016). Incidence of antimicrobial-resistance genes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from eels and aquaculture ponds. *Dis. Aquat. Organ.* 120:115–123.

Liu, J.L., Xu, X.R., Ding, Z.H., Peng, J.X., Jin, M.H., Wang, Y.S., Hong, Y.G., Yue, W.Z. (2015). Heavy metals in wild marine fish from South China Sea: levels, tissue- and species-specific accumulation and potential risk to humans. *Ecotoxicol.* 24:1583–1592.

Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci. Rep.* 6:24340.

Lopatek, M., Wiczorek, K., Osek, J. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from raw shellfish in Poland. *J. Food Protect.* 78:1029–1033.

López Aguayo, M.C., Grande Burgos, M.J., Lucas López, R., Gálvez, A. (2010). Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. *Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 23:121-136.

Lucera, A., Costa, C., Conte, A., Del Nobile, M.A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Front. Microbiol.* 3:287.

Mahanty, A., Mishra, S., Bosu, R., Maurya, U., Netam, S.P., Sarkar, B. (2013). Phytoextracts-Synthesized Silver Nanoparticles Inhibit Bacterial Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Indian J. Microbiol.* 53(4):438–446.

Malik, A., Aleem, A. (2011). Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ. Monit. Assess.* 178:293–308.

Martínez, J.L., Vicente, M.F., Delgado-Iribarren, A., Pérez-Díaz, J.C., Baquero, F. (1989). Small plasmids are involved in amoxycilli clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 595.

Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157:2893–2902.

Mataseje, L.F., Peirano, G., Church, D.L., Conly, J., Mulvey, M., Pitout, J.D. (2016). Colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 654 with blaNDM-1 arrives in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:1794 –1800.

Matyar, F., Akkan, T., Uçak, Y., Eraslan B. (2010). *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ. Monit. Assess.* 167:309–320.

Matyar, F. (2012), Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. *B. Environ. Contam. Tox.* 89:551–556.

McDonnell, G., Russell, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147-179.

McNamara, P.J., LaPara, T.M., Novak, P.J. (2014). The impacts of triclosan on anaerobic community structures, function, and antimicrobial resistance. *Environ. Sci. Technol.* 48:7393–7400.

Moken, M.C., McMurry, L.M., Levy, S.B. (1997). Selection of multiple antibiotic resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the *mar* and *acrAB* loci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2770–2772.

Molony, B. (2001). Environmental requirements and tolerances of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta*) with special reference to Western Australia: A review, Published by Department of Fisheries Perth, Western Australia November 5 p.

Monchy, S., Benotmane, M.A., Janssen, P., Vallaes, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., Mergeay M. (2007). Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *J. Bacteriol.* 189(20):7417-7425.

Moreira, M.A.S., De Souza, E.C., De Moraes, C.A. (2004). Multidrug efflux systems in gram-negative bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 35: 19-28.

Mulvey, M.R., Boyd, D., Olson, A.B. (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microb. Infect.* 8:1915–1922.

Muziasari, W.I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S., Virta, M. (2014). Sulphonamide and trimethoprim resistance genes persist in sediments at Baltic Sea aquaculture farms but are not detected in the surrounding environment. *PLoS ONE* 9:e92702.

Ndi, O.L., Barton, M.D. (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* 34:589–599.

Newaj-Fyzul, A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Adesiyun, A. (2008). Prevalence of bacterial pathogens and their anti-microbial resistance in tilapia and their pond water in Trinidad. *Zoon. Publ. Health.* 55:206–213.

Nies, D.H., Silver, S. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730-50.

Nies, D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 27:313-339.

Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Sci.* 264: 382-388.

Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., Livermore, D.M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 19:588–595.

Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G.V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 115:290-296.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2016). *Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos*. Ginebra: OMS.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017a). *Nota de prensa de 27 de febrero de 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. Ginebra: OMS.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017b). *Nota de prensa de 27 de septiembre de 2017. Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos*. Ginebra: OMS.

Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande-Burgos, M.J., Abriouel, H., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 162:13–25.

Ottaviani, D., Leoni, F., Talevi, G., Masini, L., Santarelli, S., Rocchegiani, E., Susini, F., Montagna, C., Monno, R., D'Annibale, L., Manso, E., Oliva, M., Pazzani, C. (2013). Extensive investigation of antimicrobial resistance in *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish and clinical sources, Italy. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 42:191–193.

Pakingking, R. Jr., Palma, P., Usero, R. (2015). Quantitative and qualitative analyses of the bacterial microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in earthen ponds in the Philippines. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31:265-275.

Parmar, K.M., Hathi, Z.J., Dafale, N.A. (2017). Control of multidrugresistant gene flow in the environment through bacteriophage intervention. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181:1007–1029.

Patel, S. (2015). Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 32:1049-1164.

Pech, Z.G.H., Chavez, C.M.R., Reynoso, F.L. (2017). Pathogenic bacteria in *Oreochromis niloticus* var. Stirling tilapia culture. *Fish. Aqua. J.* 8:197.

Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538–582.

Pereira, R.P.A., Peplies, J., Brettar, I., Höfle, M.G. (2017). Development of a genus-specific next generation sequencing approach for sensitive and quantitative determination of the *Legionella* microbiome in freshwater systems. *BMC Microbiol.* 17, 79. Rafael, D., 2008. Tilapia farming: a global review (1924–2004). *Asia Life Sci.* 17, 207–229.

Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and species. *J. Med. Microbiol.* 58:1454-1462.

Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., Nordmann, P. (2011). Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5403–5407.

Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gramnegative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2233- 2241.

Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:20–51.

Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals Med.* 39:162–176.

Rafael, D. (2008). Tilapia farming: a global review (1924–2004). *Asia Life Sci.* 17:207–229.

Ravi, S., Sita, P., Janardhan, K. (2008). Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. *World J. Microbial Biotechnol.* 24:1909-1914.

Reglamento (CE) N° 853/2004 del parlamento europeo y del consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (DO L 139 de 30.4.2004, p. 55).

Reglamento (CE) No 178/2002 del parlamento europeo y del consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (DO L 31 de 1.2.2002, p. 1).

Reglamento (CE) No 852/2004 del parlamento europeo y del consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios (DO L 139 de 30.4.2004, p. 1).

Reglamento (UE) N° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y uso de los biocidas. DOUE L167 de 27-06-2012

Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties- an Overview. *Forsch Komplementmed* 16:79-90.

Rodas-Suárez, O., Flores-Pedroche, J., Betancourt-Rule, J., Qui-ones-Ramírez, E. I., Vázquez-Salinas, C. (2006). Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7410–7412.

Romero, J.L., Grande Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R. (2017). Resistance to antibiotics, biocides, preservatives and metals in bacteria isolated from seafoods: co-selection of strains resistant or tolerant to different classes of compounds. *Front Microbiol.* 8:1650.

Rotger, R. Martínez, M. (2016). Fármacos antimicrobianos. Mecanismo de acción y resistencia. *Capítulo 2. Resistencia a antibióticos.*

Ruiter, A. (1999). El pescado y los productos derivados de la pesca composición, propiedades nutritivas y estabilidad.. Ed. Acribia S.A.

Russell, A.D., Gould, G.W. (1988). Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 17: 167-195.

Russell, A.D. (1997). Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J. Appl. Microbiol.* 82:155-165.

Russell, A.D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 92: 121S–135S.

Sabry, S.A., Ghozalan, H.A., Abou-Zeid, D.M. (1997). Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J. Appl. Microbiol.* 62:245–252.

Samaja-Kfoury, J.N., Araj, G.F. (2003). Recent development in beta-lactamases and extended spectrum β lactamases. *BMJ* 327:1209-1213.

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Available online at: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf (Accessed May 2, 2017)

Seiler, C., Berendonk, T.U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol.* 3:399.

Shah, S.Q., Cabello, F.C., L'abée-Lund, T.M., Tomova, A., Godfrey, H.P., Buschmann, Sørum H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environ. Microbiol.* 16:1310–1320.

Shukla, O.P., Rai, U.N., Dubey, S., Mishra, K. (2006). Bacterial Resistance: A Tool For Remediation of Toxic Metal Pollutants. *Environ News.* 2006;12(2).

Silver, S, Phung, L.T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:753-789.

Silver, S., Phung, L.T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:587-605.

Standen, B.T., Rodiles, A., Peggs, D.L., Davies, S.J., Santos, G.A., Merrifield, D.L. (2015). Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:8403-8417.

Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. (2012). *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45:502–531.

Sterritt, R.M., Lester, J.N. (1980). Interaction of heavy metals with bacteria. *Sci. Total Environ.* 14:5–17.

Stokes, H.W., Gillings, M. (2011). Gene flow mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:790–819.

Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:664–689.

Takahashi, H., Kuramoto, S., Miya, S., Koiso, H., Kuda, T., Kimura, B. (2011). Use of commercially available antimicrobial compounds for prevention of *Listeria monocytogenes* growth in ready-to-eat minced tuna and salmon roe during shelf life. *J. Food Prot.* 74:994-998.

Tan, L.T.H., Chan, K.G., Lee, L.H., Goh, B.H. (2016). Streptomyces bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Front. Microbiol.* 7:79.

Teitzel, G.M., Parsek, M.R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2313–2320.

Teixeira, P., Tacão, M., Alves, A., Henriques, I. (2016). Antibiotic and metal resistance in a ST395 *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate: a genomics approach. *Mar. Pollut. Bull.* 110:75–81.

Tezel, U., Pavlostathis, S.G. (2015). Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*, 33: 296-304.

Toleman, M.A., Bennett, P.M., Bennett, D.M., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg. Infect. Dis.* 13:559–565

Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., Actis, L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiol.* 149:3473–3484.

Torres-Barceló, C., Franzon, B., Vasse, M., Hochberg, M.E. (2016). Long-term effects of single and combined introductions of antibiotics and bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol. Appl.* 9:583–595.

Trevors, J.T., Oddie, K.M., Belliveau, B.H. (1985). Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:39–54.

Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H. (2008). Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:43–48.

Uluozlu, O.D., Tuzen, M., Mendil, D., Soylak, M. (2007). Trace metal content in nine species of fish from the black and Aegean seas, Turkey. *Food Chem.* 104:835–840.

Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A.H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Goh, K.K., De Loy, A., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *Int. J. Food Microbiol.* 133:94-104.

Veldman, K., Cavaco, L.M., Mevius, D., Battisti, A., Franco, A., Botteldoorn, N., Bruneau, M., Perrin-Guyomard, A., Cerny, T., De Frutos Escobar, C., Guerra, B., Schroeter, A., Gutierrez, M., Hopkins, K., Myllyniemi, A.L., Sunde, M., Wasyl, D., Aarestrup, F.M. (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1278–1286.

Von Rozycki, T., Nies, D.H. (2009). *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 96(2):115-39.

Wales, A. D., Davies, R.H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiot. (Basel)* 4(4):567–604.

Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., Toleman, M.A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 11:355–362.

Wang, W., Li, M., Li, Y. (2015). Intervention strategies for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: a review. *J. Food Sci.* 80(1):R10-19.

Watermann, B.T., Daehne, B., Sievers, S., Dannenberg, R., Overbeke, J.C., Klijnstra, J.W., Heemken, O. (2005). Bioassays and selected chemical analysis of biocide-free antifouling coatings. *Chemosphere* 60:1530–1541.

Watts, J.E.M., Schreier, H.J., Lanska, L., Hale, M.S. (2017). The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Mar. Drugs* 15:e158.

Webber, M.A., Coldham, N.G., Woodward, M.J. Piddock, L.J.V. (2008). Proteomic analysis of triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:92-97.

Wong, M.H., Chen, S. (2013), First detection of *oqxAB* in *Salmonella* spp. isolated from food. *Antimicrob Agents Chemother* 57:658-660.

Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 30 (1), 409–447.

Woolhouse, M., Farrar, J. (2014), Policy: an intergovernmental panel on antimicrobial resistance. *Nature* 509:555

Xie, T., Wu, Q., Xu, X., Zhang, J., Guo, W. (2015), Prevalence and population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products from South China markets. *FEMS Microbiol. Lett.*

Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., Zeng, Z. (2015). Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microb. Ecol.* 70:425–432.

Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology-past, present and future step towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.* 50:75–104.

Yoon, E., Goussard, S., Touchon, M., Krizova, L., Cerqueira, G., Murphy, C., Lambert, T., Grillot-Courvalin, C., Nemec, A., Courvalin, P. (2014). Origin in *Acinetobacter guillouiae* and dissemination of the aminoglycoside-modifying enzyme Aph(3=)-VI. *mBio* 5(5):e01972-14.

Yücel, N., Balci, S. (2010), Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. *J. Food Prot.* 73:380-384.

Zelikoff, J.T. (1993). Metal pollution-induced immunomodulation in fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3:305–325.

Zhao, S., Feng, C., Quan, W., Chen, X., Niu, J., Shen, Z. (2012). Role of living environments in the accumulation characteristics of heavy metals in fishes and crabs in the Yangtze river estuary, China. *Mar. Pollut Bull.* 64:1163–1171.