

## Resistencia antimicrobiana en redes de saneamiento a escala urbana

La resistencia antimicrobiana (AMR) representa uno de los mayores desafíos sanitarios del siglo XXI, con las redes de saneamiento urbano actuando como potenciales reservorios y vías de dispersión de bacterias resistentes. Este artículo presenta los resultados del proyecto GAUSS, una iniciativa pionera que ha mapeado la presencia de genes y bacterias resistentes en el alcantarillado de Sabadell, estableciendo las bases para un sistema de vigilancia epidemiológica basado en aguas residuales que contribuye al enfoque integrado “One Health”.

La resistencia a los antimicrobianos (AMR, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una amenaza importante para la salud pública a nivel mundial y representa uno de los mayores retos sanitarios del siglo XXI. Su expansión, propiciada por el uso inadecuado y excesivo de antibióticos tanto en el ámbito clínico como el doméstico, compromete la eficacia terapéutica al provocar la aparición de bacterias patógenas capaces de resistir los tratamientos convencionales, y genera, a la vez, un impacto sanitario y económico de gran escala. Las aguas residuales urbanas, donde confluyen residuos hospitalarios, domésticos e industriales, pueden actuar como reservorios de genes de resistencia antimicrobiana (ARGs), bacterias resistentes (ARBs) y bacterias multiresistentes (MDR), facilitando su dispersión ambiental.

El sistema de alcantarillado urbano constituye un punto clave para comprender y abordar esta problemática. En este sentido, la epidemiología basada en aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés) se ha consolidado como una estrategia eficaz para monitorizar la presencia de contaminantes biológicos y químicos en la población, habiéndose validado su utilidad durante la pandemia de la COVID-19 y emerge como herramienta estratégica para la monitorización de la AMR en el contexto del enfoque “One Health”. Sin embargo, los estudios a escala de ciudad, que permiten identificar fuentes puntuales de descarga de ARGs y MDR dentro de una red de saneamiento, aún son escasos.

Además, hay que tener en cuenta que si bien las aguas residuales se tratan en las Estaciones Depuradoras de

## Antimicrobial resistance in urban sanitation networks

Antimicrobial resistance (AMR) represents one of the greatest health challenges of the 21st century, with urban sanitation networks acting as potential reservoirs and pathways for the spread of resistant bacteria. This article outlines the results of the GAUSS project, a pioneering initiative that has mapped the presence of resistant genes and bacteria in the sanitation system of Sabadell, laying the foundations for a wastewater-based epidemiological surveillance system that contributes to the integrated “OneHealth” approach.

Antimicrobial resistance (AMR) has become a major threat to public health worldwide and constitutes one of the greatest health challenges of the 21st century. The spread of AMR, driven by inappropriate and excessive use of antibiotics in both clinical and domestic settings, compromises therapeutic efficacy by promoting the development of pathogenic bacteria capable of resisting conventional treatments, while generating a large-scale health and economic impact. Urban wastewater, where hospital, household and industrial waste converge, can act as a reservoir for antimicrobial resistance genes (ARGs), antibiotic-resistant bacteria (ARBs) and multidrug-resistant (MDR) bacteria, facilitating their dispersal in the environment.

The urban sanitation system is of key importance in understanding and addressing this issue. Wastewater-based epidemiology (WBE) has become established as an effective strategy for monitoring the presence of biological and chemical contaminants in the population, having been validated during the COVID-19 pandemic and emerging as a strategic tool for AMR monitoring in the context of the “OneHealth” approach. However, city-scale studies, which allow the identification of point sources of ARGs and MDR bacteria discharge within a sanitation network, are still scarce.

Furthermore, it should be noted that although wastewater is treated at Wastewater Treatment Plants (WWTPs), the treatment processes are not



Agua Residual (EDARs), los tratamientos de depuración no están optimizados para la eliminación completa de antibióticos y bacterias resistentes y en consecuencia, pueden llegar a ecosistemas naturales como ríos y mares.

### **EL PROYECTO: EL CASO DE SABADELL**

Ante este reto, Cetaqua-Centro Tecnológico del Agua, el Institut d'investigació i innovació Parc Taulí (I3PT), el Hospital Universitari Parc Taulí, Aigües Sabadell y Labaqua colaboraron en el proyecto GAUSS, con el objetivo de conocer la prevalencia de bacterias y genes de resistencia a los antibióticos en puntos clave de la red de alcantarillado de Sabadell (Barcelona, Cataluña) con el principal objetivo de identificar posibles focos de origen de AMR para anticiparse a la emisión de estas al medio, contribuyendo a la toma de decisiones para posibles regulaciones, comunicaciones o adaptación de la administración de antibióticos a la población.

Para ello, GAUSS combinó análisis metagenómicos, fenotípicos y genómicos para caracterizar tanto ARGs como ARBs y MDR. Esta aproximación integral permitió caracterizar con alta precisión los focos de mayor riesgo y establecer relaciones entre la actividad humana —especialmente hospitalaria— y la presencia de AMR.

### **DESAFÍO SANITARIO QUE ABORDA EL PROYECTO**

Ante un contexto donde la presión antibiótica en sectores hospitalarios y urbanos densamente poblados contribuye activamente a la proliferación de bacterias resistentes a los antibióticos, GAUSS facilita una toma de decisiones más informada. Identificar con precisión los sectores que presentan una mayor carga genética de resistencias es clave para definir intervenciones dirigidas, tanto en términos de tratamiento localizado como de políticas de concienciación y prevención.

La cartografía del resistoma urbano, entendida como una herramienta de salud pública, se alinea con el enfoque "One Health" de la OMS. Este enfoque reconoce la interdependencia entre la salud humana, animal y ambiental, y promueve estrategias integradas para hacer frente a desafíos globales como la AMR.

### **PRUEBAS PILOTO, TESTEOS Y MÉTODOS DE MUESTREO**

Durante el proyecto, se realizaron distintos muestreos en siete puntos estratégicos del sistema de saneamiento de Sabadell, incluyendo dos entradas a EDAR (Riu Ripoll y Riu Sec), una salida de EDAR, un sector hospi-

*El estudio de diferentes puntos clave de la red de alcantarillado demuestra que el efluente del hospital presenta la mayor abundancia y diversidad de ARGs y ARBs.*

optimised for the complete removal of antibiotics and resistant bacteria, which can, therefore, end up in natural ecosystems such as rivers and seas.

### **THE PROJECT: THE CASE OF SABADELL**

To address this challenge, Cetaqua-Water Technology Centre, el Institut d'investigació i innovació Parc Taulí (I3PT), Hospital Universitari Parc Taulí, Aigües Sabadell and Labaqua collaborated on the GAUSS project. The goal was to gather information on the prevalence of bacteria and antibiotic resistance genes at key points of the sanitation network in Sabadell (Barcelona, Catalonia), with the primary objective being to identify potential AMR sources in order to anticipate the release of these genes into the environment, thus aiding decision-making associated with possible legislation, communications or adaptation of the administration of antibiotics to the population.

To achieve this, GAUSS combined metagenomic, phenotypic and genomic analyses to characterise ARGs, ARBs and MDR bacteria. This comprehensive approach enabled high-precision characterisation of the source points of greatest risk and the establishment of relationships between human activity —especially healthcare practices in hospital environments— and the presence of AMR.

### **HEALTH CHALLENGE ADDRESSED BY THE PROJECT**

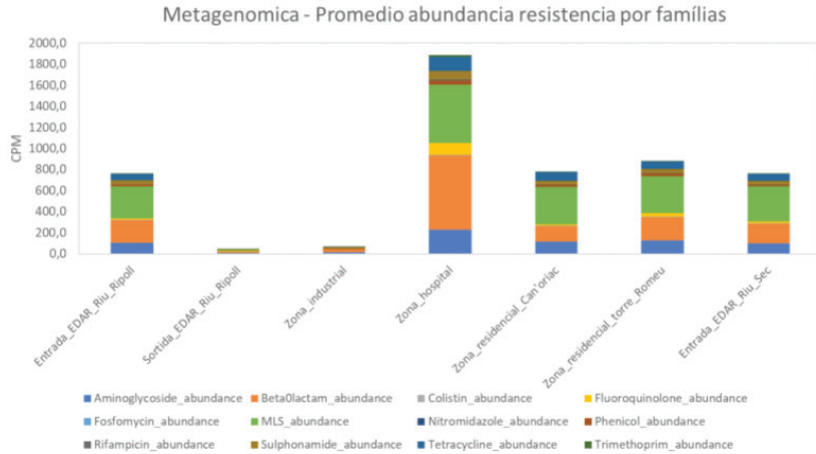
In a context where antibiotic pressure in densely populated hospital and urban areas actively contributes to the proliferation of antibiotic resistant bacteria, GAUSS supports more informed decision-making. Accurately identifying the areas with the highest gene resistance burden is essential to define targeted interventions, in terms of both localised treatment and awareness and prevention policies.

Urban resistome mapping, understood as a public health tool, is aligned with the WHO "OneHealth" approach. This approach recognises the interdependence between human, animal and environmental health, and promotes integrated strategies to address global challenges such as AMR.

### **PILOT TESTING, TRIALS AND SAMPLING METHODS**

During the project, sampling was carried out at seven strategic points in Sabadell's sanitation system, including two WWTP inlets (Riu Ripoll and RiuSec), a WWTP outlet, a hospital area, an industrial area and

*The study of key points of the sanitation network shows that hospital effluent has the highest abundance and diversity of ARGs and ARBs.*



talario, una zona industrial y dos barrios residenciales. Estas muestras se recogieron bajo condiciones meteorológicas representativas para evitar diluciones por lluvias, y en cuatro campañas correspondientes a distintos periodos del año (julio, octubre, noviembre de 2022, y febrero de 2023). Esto ha permitido evaluar también la posible variación estacional de la AMR.

El análisis incluyó secuenciación del ADN extraído de las muestras, que permitió identificar la composición microbiana y la abundancia de ARGs mediante análisis por metagenómica. Asimismo, dada su relevancia clínica, se identificaron bacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos y metilicina utilizando medios de cultivo selectivos. Las bacterias resistentes detectadas se identificaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF) y pruebas fenotípicas de sensibilidad a antibióticos. Posteriormente, se seleccionó un conjunto representativo de estos aislados bacterianos para su secuenciación genómica completa, con el fin de explorar en detalle los mecanismos de resistencia y la posible presencia de plásmidos como vectores de diseminación.

## RESULTADOS OBTENIDOS

Los análisis revelaron que el efluente hospitalario (P4) fue el punto que presentó mayor concentración y diversidad de ARGs, así como de bacterias resistentes, lo que lo convierte en el principal foco de diseminación. Se detectaron genes críticos como blaOXA-48, blaTEM-1B, blaKPC-2 y sul1, muchos de ellos asociados a plásmidos, lo cual confirma su alta capacidad de diseminación entre la población bacteriana. La comunidad microbiana en este sector estuvo dominada por géneros típicamente hospitalarios como Klebsiella, Enterobacter y Acinetobacter.

Las entradas a las EDAR (P1 y P7) y los sectores residenciales (P5 y P6) presentaron una carga intermedia, con perfiles más heterogéneos de ARGs y menor abundancia. En contraste, la salida de la EDAR (P2) mostró una notable reducción de ARGs, sin embargo, persisten

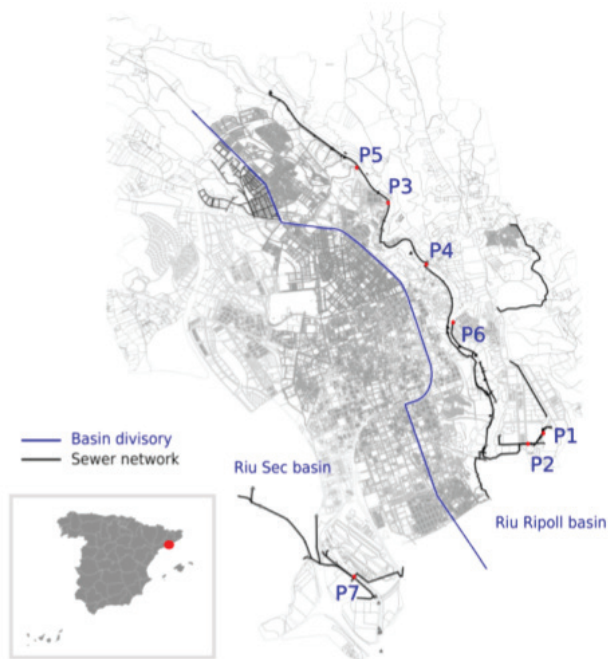
two residential areas. These samples were collected under representative meteorological conditions to prevent distortions in results due to dilution from rainfall, and in four campaigns undertaken at different times of the year (July, October, November 2022, and February 2023). This also enabled potential seasonal variations in AMR to be evaluated.

The analysis included sequencing of DNA extracted from the samples, enabling identification of microbial composition and the abundance of ARGs through metagenomic analysis. Due to their clinical relevance, bacteria resistant to third-generation cephalosporins, carbapenems, and methicillin were isolated using selective culture media. The resistant isolates were then identified by MALDI-TOF mass spectrometry and characterized via phenotypic antibiotic susceptibility testing. Subsequently, a representative set of these isolates underwent whole-genome sequencing to explore resistance mechanisms in detail and assess the potential role of plasmids in resistance gene dissemination.

## RESULTS OBTAINED

Analyses revealed that the hospital effluent (P4) had the highest concentration and diversity of ARGs and resistant bacteria, positioning it as the primary source of dissemination. Critical resistance genes such as blaOXA-48, blaTEM-1B, blaKPC-2, and sul1 were detected—many associated with plasmids—confirming their high potential for dissemination within the bacterial population. The microbial community at this site was dominated by genera typically linked to hospital environments, including Klebsiella, Enterobacter, and Acinetobacter.

The WWTP inlets (P1 and P7) and the residential sectors (P5 and P6) had an intermediate load, with more heterogeneous profiles and lower abundance of ARGs. In contrast, there was a notable reduction in ARGs at the WWTP outlet (P2), although, genes such



**IMAGEN.** Localización de los puntos de monitorización: P1 y P7 entrada EDARs, P2: Salida EDAR, P4: Zona hospital, P3 Zona industrial, P5 y P6 Zonas residenciales.

**IMAGEN.** Location of monitoring points: P1 & P7 WWTP inlets, P2 WWTP outlet, P4 Hospital area, P3 Industrial area, P5 & P6 Residential areas

tieron genes como *msr(E)* y *erm(F)* en el efluente. En concreto, se demostró que la planta de tratamiento de aguas residuales a estudio durante el proyecto GAUSS logró reducir hasta un 93,3% la presencia de bacterias y genes de resistencia (ARB y ARGs).

La zona industrial (P3), por su parte, exhibió una menor carga de ARGs, aunque con perfiles particulares como una elevada presencia del gen *mcr-7.1*, relacionado con resistencia a colistina.

### CONCLUSIONES Y PRÓXIMOS PASOS

Todos estos datos han servido para crear una plataforma de vigilancia epidemiológica basada en aguas residuales más efectiva, ayudando a mejorar la toma de decisiones ante esta problemática emergente. Así, el proyecto GAUSS permitió sentar las bases para implementar medidas específicas de control. Se recomienda, en primer lugar, el tratamiento previo del efluente hospitalario antes de su descarga al sistema de alcantarillado urbano, dado su papel como fuente significativa de AMR. Y, en segundo lugar, se propone el uso de genes como *blaOXA-1*, *blaTEM-1*, *blaKPC-2*, *msr(E)* y *erm(F)* como marcadores para el seguimiento rutinario de la resistencia antimicrobiana en redes urbanas. Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista científica *Science of the Total Environment*, en el artículo de Díaz-García et al. 2025.

*El diseño de tratamientos descentralizados para la eliminación de contaminantes de preocupación emergente evitará su propagación a otros ecosistemas*

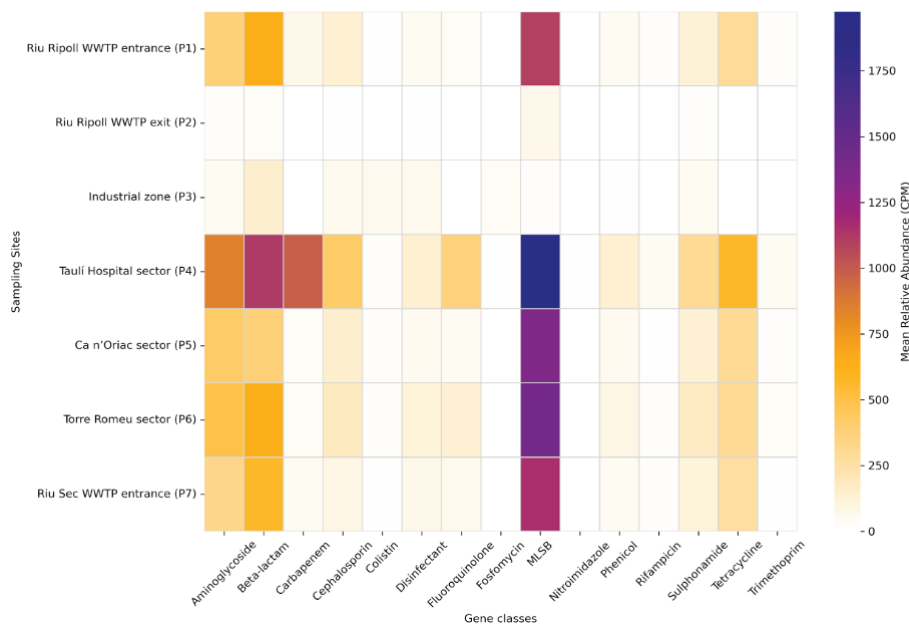
as *msr(E)* and *erm(F)* persisted in the effluent. It was demonstrated that the WWTP studied as part of the GAUSS project was capable of reducing the presence of bacteria and resistance genes (ARB and ARGs) by up to 93.3%.

The industrial zone (P3) exhibited a lower ARG load, although with specific profiles such as a high presence of the *mcr-7.1* gene, related to colistin resistance.

### CONCLUSIONS AND NEXT STEPS

All this data serves to create a more effective wastewater-based epidemiological surveillance platform, helping to improve decision-making on this emerging problem. The GAUSS project has laid the basis for the implementation of specific control measures. Firstly, pretreatment of hospital effluent prior to discharge into the urban sanitation system is recommended, given its role as a significant source of AMR. Secondly, the use of genes such as *blaOXA-1*, *blaTEM-1*, *blaKPC-2*, *msr(E)* and *erm(F)* as markers for routine monitoring of antimicrobial resistance in urban networks is proposed. The results of this study have been published in an article by Díaz-García et al. 2025 in the scientific journal *Science of the Total Environment*.

*Designing decentralised treatment for the removal of contaminants of emerging concern will prevent them spreading to other ecosystems.*



**IMAGEN.** Mapa de calor que representa las clases de genes de resistencia más abundantes (eje horizontal) en los diferentes puntos de muestreo caracterizados (eje vertical). La escala de colores de blanco a naranja representa la abundancia de clases de ARGs

**IMAGEN.** Heat map representing the most abundant resistance genes (horizontal axis) at the different characterized sampling points (vertical axis). The colour scale from white to orange represents the abundance of ARG classes

Por otro lado, el cumplimiento de la nueva Directiva Europea 2024/3019, que establece la obligación de monitorear la AMR en EDARs de más de 100.000 habitantes, y la futura incorporación de tratamientos cuaternarios antes de 2045, refuerza la necesidad de este tipo de estudios. En este marco regulatorio emergente, GAUSS representa una referencia metodológica y estratégica para otras ciudades europeas.

En este sentido, el mapeo urbano de la resistencia antimicrobiana emerge como una herramienta fundamental para anticipar riesgos sanitarios, orientar inversiones en infraestructuras y consolidar políticas públicas integradas bajo una lógica de salud ambiental compartida.

Además, los resultados obtenidos sirvieron para plantear nuevos proyectos como LIFE GENESYS cofinanciado por la Comisión Europea. Este proyecto, actualmente en curso, instalará una planta de tratamiento del agua residual para tratar el efluente hospitalario, evitando de este modo la proliferación de bacterias y genes de resistencia en el resto del alcantarillado urbano y potencialmente en el medio ambiente. LIFE GENESYS, que tiene prevista su finalización a principios del año 2028, está coordinado por Cetaqua-Centro Tecnológico del Agua y cuenta con la participación del Hospital Universitari Parc Taulí, el Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Aigües de Sabadell, Labaqua y Apria.

The need to achieve compliance with the new European Directive 2024/3019, which establishes the obligation to monitor AMR in WWTPs treating the sewage of populations of over 100,000, and the future incorporation of quaternary treatments by 2045, reinforces the need for this type of study. In this emerging regulatory framework, GAUSS represents a methodological and strategic benchmark for other European cities.

Urban mapping of antimicrobial resistance has become a critical tool for identifying health risks, guiding infrastructure investments and aligning integrated public policies within a common environmental health framework.

The results obtained also served as the basis for embarking on new projects such as LIFE GENESYS, which is co-funded by the European Commission. This project, currently underway, will install a wastewater treatment plant to treat hospital effluent, thus preventing the proliferation of bacteria and resistance genes in the remainder of the urban sanitation system and potentially in the environment. LIFE GENESYS, scheduled for completion in early 2028, is coordinated by Cetaqua-Water Technology Centre and the project consortium is completed by Hospital Universitari Parc Taulí, the Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Aigües de Sabadell, Labaqua and Apria.