Universidad San Jorge

Facultad ciencias de la Salud

Identificación y estudio de nuevos productos de origen natural con actividad antimicrobiana: evaluación ecotoxicológica y combinaciones sinérgicas con antibióticos

TESIS DOCTORAL

Antonio Valenzuela Gil

Villanueva de Gállego, 2025

Universidad San Jorge

Facultad ciencias de la Salud

Identificación y estudio de nuevos productos de origen natural con actividad antimicrobiana: evaluación ecotoxicológica y combinaciones sinérgicas con antibióticos

TESIS DOCTORAL

Antonio Valenzuela Gil

Villanueva de Gállego, 2025

Directores de Tesis

Mª Rosa Pino Otín

Diego Ballestero Fernández

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel global. El empleo intensivo de antibióticos tanto en medicina humana como veterinaria ha favorecido la aparición de bacterias resistentes, lo que compromete la eficacia de tratamientos básicos y aumenta el riesgo asociado a cirugías o terapias avanzadas. Organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura advierten de que, sin alternativas efectivas, este fenómeno podría tener consecuencias devastadoras en las próximas décadas.

Un aspecto menos visible, pero igualmente relevante, es la dispersión ambiental de estos compuestos. Gran parte de los antibióticos se excretan sin ser metabolizados y llegan al entorno a través de aguas residuales urbanas o de la actividad agrícola y ganadera. Los sistemas de depuración convencionales no logran eliminarlos en su totalidad, lo que conduce a su presencia en concentraciones destacadas en ríos, lagos y suelos. Esto no solo altera comunidades microbianas naturales, sino que también incrementa la presión selectiva que impulsa la aparición de resistencias.

Frente a esta situación, es necesario impulsar estrategias terapéuticas que reduzcan la dependencia de los antibióticos tradicionales y que, al mismo tiempo, sean respetuosas con los ecosistemas. En este marco, los productos de origen natural se plantean como candidatos interesantes, bien como sustitutos directos o como coadyuvantes que potencien la acción de antibióticos ya existentes.

La presente tesis doctoral se inicia con la caracterización ecotoxicológica de cinco antibióticos sintéticos. Los resultados evidenciaron un incremento significativo de la mortalidad en organismos bioindicadores (*Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri*, *Eisenia fetida* y *Allium cepa)*, así como alteraciones estructurales y metabólicas en comunidades bacterianas de medios acuáticos y terrestres. Estos hallazgos refuerzan la preocupación sobre el impacto ambiental derivado del uso continuado de estos compuestos y subrayan la necesidad de alternativas más seguras.

Posteriormente, se seleccionaron nueve compuestos naturales identificados en la literatura científica, con el objetivo de evaluar su actividad antimicrobiana frente a 15 cepas microbianas de interés. Entre ellos, el terpineol y la hidroquinona fueron los que mostraron mayor eficacia, alcanzando concentraciones mínimas inhibitorias tan bajas

como 0.25 mg/mL y 0.5 mg/mL, respectivamente, lo que los situó como candidatos prioritarios para estudios más detallados.

No obstante, el análisis comparativo de su toxicidad ambiental reveló diferencias notables entre ambos compuestos. La hidroquinona presentó efectos adversos significativos sobre organismos sensibles, lo que limita su aplicación como alternativa sostenible. En cambio, el terpineol evidenció un perfil mucho más favorable desde la perspectiva ambiental, mostrando una mejor compatibilidad con los principios de sostenibilidad y del enfoque "*One Health*".

Si bien la actividad antimicrobiana del terpineol fue inferior a la observada con los antibióticos sintéticos, su potencial como modulador terapéutico resultó relevante. Por ello, se exploró su aplicación en tratamientos combinados con antibióticos convencionales, en lugar de considerarlo únicamente como agente independiente. Esta estrategia permitió identificar seis combinaciones sinérgicas que redujeron significativamente las dosis requeridas de ambos componentes, manteniendo una eficacia antimicrobiana elevada y disminuyendo el riesgo de selección de resistencias.

Aunque los resultados variaron según el antibiótico evaluado y se observó una ligera tendencia a una mayor toxicidad con concentraciones más altas de terpineol, en ningún caso las combinaciones efectivas superaron los niveles de toxicidad producidos por los mismos antibióticos comerciales administrados individualmente a su concentración efectiva.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que el terpineol, especialmente en combinaciones sinérgicas con antibióticos convencionales, constituye una alternativa terapéutica prometedora. Su capacidad para mantener la eficacia antimicrobiana, reducir dosis necesarias y minimizar riesgos ambientales lo sitúa como un candidato valioso dentro de estrategias integrales orientadas a preservar la salud humana, animal y ambiental bajo el marco conceptual del "*One Health*". De manera destacada, el enfoque integrador adoptado, que articula de forma simultánea análisis microbiológicos y evaluaciones ecotoxicológicas, aporta una perspectiva multidisciplinar poco frecuente en la literatura. Esta combinación metodológica permite no solo valorar la eficacia antimicrobiana de los compuestos, sino también anticipar sus implicaciones ambientales, constituyendo así el principal rasgo diferencial y el valor añadido más significativo de la presente tesis.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de una u otra manera, a la realización de esta tesis.

En primer lugar, deseo agradecer a los miembros del Grupo ECO2CHEM, y muy especialmente a mis directores, Rosa y Diego, por su guía, apoyo constante y dedicación. Sus orientaciones han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo y para mi crecimiento académico y personal.

Agradezco también al personal de la USJ, con mención especial a los técnicos de laboratorio, por su disposición, paciencia y ayuda en cada etapa experimental. Su trabajo y profesionalidad han sido esenciales para avanzar con seguridad y confianza.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por acompañarme en los momentos difíciles y por celebrar conmigo cada pequeño logro. Sin su ánimo y cariño, este camino habría sido mucho más complicado.

A mis amigos, por su comprensión y por mantenerse a mi lado incluso cuando el tiempo era limitado. Su apoyo ha sido fundamental y muy apreciado.

Asimismo, quiero agradecer a Novaltia, al Banco Sabadell y al Gobierno de Aragón por la financiación y el respaldo que han hecho posible el desarrollo de esta tesis.

Finalmente, a todas las personas que, de manera directa o indirecta, han colaborado en este proyecto: gracias por su tiempo, sus aportes y su confianza.

Índice general

Capítulo 1 Introducción 1

1.1 Visión global de la tesis realizada 3

1.2 Lista de artículos científicos 5

Capítulo 2 Antecedentes 7

2.1 Orígenes de la terapia antimicrobiana 9

2.1.1 El uso global de antibióticos humanos: Una tendencia en aumento 12

2.1.2 El uso global de antibióticos veterinarios: Una regulación desigual 15

2.2 Repercusiones negativas del empleo de los antibióticos 19

2.2.1 Resistencia antimicrobiana 19

2.2.1.1 Orígenes y principales mecanismos de la resistencia antimicrobiana 24

2.2.1.2 Consecuencias de la resistencia a los antibióticos 25

2.2.2 Presencia de antibióticos en el medio ambiente 27

2.2.2.1 Fuentes de antibióticos en el medio ambiente 27

2.2.2.2 Concentraciones de antibióticos detectadas en el medio ambiente 28

2.2.2.3 Persistencia de los antibióticos 33

2.2.3 Consecuencias de la presencia de antibióticos en el medio ambiente 34

2.3 Soluciones ante las resistencias y la ecotoxicidad de los antibióticos 37

2.3.1 Medidas psicosociales 37

2.3.2 Investigación de alternativas a los antibióticos 39

2.3.2.1 Productos naturales antimicrobianos 41

2.3.2.2 Bacteriófagos 46

2.3.2.3 Terapias basadas en CRISPR-Cas 47

2.3.2.4 Inmunoterapia 49

Capítulo 3 Justificación 51

3.1 Precedentes que justifican la presente tesis 53

3.2 Ventajas de la Propuesta de la tesis: Estrategia de combinación de productos naturales con antibióticos ya comercializados 57

3.3 Aspectos innovadores de la tesis 59

Capítulo 4 Hipótesis y Objetivos 61

Capítulo 5 Materiales 65

5.1 Selección de los productos naturales 67

5.1.1 Ácido ferúlico 67
5.1.2 Citronellal 68
5.1.3 Hidroquinona 69
5.1.4 Lisozima 70
5.1.5 Mentol 71
5.1.6 Naringenina 72
5.1.7 Papaína 73
5.1.8 Quercetina 74
5.1.9 Terpineol 75
5.1.10 Tabla resumen de las propiedades de los productos naturales empleados 76

5.2 Selección de antibióticos 77

5.2.1 Amoxicilina 77
5.2.2 Ampicilina 77
5.2.3 Cloranfenicol 78
5.2.4 Clortetraciclina 78
5.2.5 Eritromicina 78
5.2.6 Estreptomicina 79
5.2.7 Florfenicol 79
5.2.8 Gentamicina 79
5.2.9 Neomicina 80
5.2.10 Oxitetraciclina 80
5.2.11 Penicilina G 80
5.2.12 Sulfadiazina 81
5.2.13 Tetraciclina 81
5.2.14 Tabla resumen de las propiedades de los antibióticos empleados 82

5.3 Selección de microorganismos 83

Capítulo 6 Metodología 89

6.1 Ensayos de ecotoxicidad 91

6.1.1 Ensayo de toxicidad sobre *Daphnia magna* 91
6.1.2 Ensayo de toxicidad sobre *Aliivibrio fischeri* 92

6.1.3 Ensayo de toxicidad sobre *Eisenia fetida* 94
6.1.4 Ensayo de toxicidad sobre *Allium cepa* 95
6.1.5 Ensayos de toxicidad sobre comunidades microbianas 96
6.1.5.1 Recolección y procesado de muestras de agua 98
6.1.5.2 Recolección y procesado de muestras de suelo 98
6.1.5.3 Identificación genética de las comunidades microbianas 100
6.1.5.4 Perfil fisiológico a nivel comunitario (CLPP) de microorganismos de agua y suelo 101
6.1.6 Análisis estadísticos y visualización de datos 102
6.2 Actividad antimicrobiana 105
6.2.1 Toxicidad de los disolventes 105
6.2.2 Solubilidad de los productos naturales en los disolventes orgánicos 106
6.2.3 Ensayo de concentración mínima inhibitoria de los productos naturales 107
6.2.4 Ensayo de concentración mínima inhibitoria de los antibióticos 110
6.2.5 Estudio de las combinaciones entre producto natural y antibiótico 111
6.2.5.1 Determinación del tipo de actividad combinada 111
6.2.5.2 Determinación de las cinéticas de crecimiento de las sinergias 113
6.2.5.3 Determinación de los efectos bactericidas de las sinergias 115
6.2.6 Determinación de los efectos en la generación de resistencias de las sinergias 116
Capítulo 7 Resultados 119
7.1 BLOQUE I: Ecotoxicidad de antibióticos 121
7.1.1 Resumen 122
7.1.2 Información específica sobre material y métodos 124
7.1.3 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *D. magna* 126
7.1.4 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *A. fischeri* 130
7.1.5 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *E. fetida* 133
7.1.6 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *A. cepa* 135
7.1.7 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre las comunidades microbianas 138
7.1.7.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua 138
7.1.7.2 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas acuáticas 138
7.1.7.3 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas terrestres 143
7.1.7.4 Efecto de los antibióticos en las comunidades bacterianas acuáticas y terrestres: AWCD y CLPP 146
7.2 BLOQUE II: Actividad antimicrobiana de los productos naturales individuales 162
7.2.1 Resumen 163
7.2.2 Información específica sobre material y métodos 165
7.2.3 Ensayo de toxicidad de los disolventes 165

7.2.4 Ensayo de solubilidad de los productos naturales en los disolventes orgánicos . 167
7.2.5 Concentración mínima inhibitoria de los productos naturales 169
7.2.6 Selección de productos naturales con mayor actividad antimicrobiana 174
7.2.7 Concentración mínima inhibitoria de los antibióticos 178
7.3 BLOQUE III: Ecotoxicidad de los productos naturales con actividad antimicrobiana 180
7.3.1 Resumen 181
7.3.2 Información específica sobre material y métodos 183
7.3.3 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *D. magna* 184
7.3.4 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *A. fischeri* 187
7.3.5 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *E. fetida* 190
7.3.6 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *A. cepa* 193
7.3.7 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre las comunidades microbianas ... 196
7.3.7.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua 196
7.3.7.2 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas acuáticas 196
7.3.7.3 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas terrestres 201
7.1.7.4 Efecto de los productos naturales en las comunidades bacterianas acuáticas y terrestres: AWCD y CLPP 204
7.4 BLOQUE IV: Actividad antimicrobiana de los productos naturales en combinación con antibióticos 216
7.4.1 Resumen 217
7.4.2 Información específica sobre material y métodos 219
7.4.3 Actividad antimicrobiana de las combinaciones entre terpineol y antibióticos ... 220
7.4.4 Determinación de los efectos en la generación de resistencias de las sinergias 238
7.4.2.1 Efectos en la generación de resistencias por parte del terpineol 241
7.4.4.1 Efectos en la generación de resistencias por parte de los antibióticos 242
7.4.4.2 Efectos en la generación de resistencias por parte de la combinación de terpineol y antibióticos 247
7.5 BLOQUE V: Ecotoxicidad de los productos naturales en combinación con antibióticos 248
7.5.1 Resumen 249
7.5.2 Información específica sobre material y métodos 251
7.5.3 Ecotoxicidad de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos sobre *D. magna* 253
7.5.3.1 Ecotoxicidad sobre *D. magna* del terpineol 253
7.5.3.2 Ecotoxicidad sobre *D. magna* de los antibióticos 255

7.5.3.3 Ecotoxicidad sobre *D. magna* de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos 257
7.5.4 Ecotoxicidad de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos sobre *A. fischeri* 268
7.5.4.1 Ecotoxicidad sobre *A. fischeri* del terpineol 268
7.5.4.2 Ecotoxicidad sobre *A. fischeri* de los antibióticos 268
7.5.4.3 Ecotoxicidad sobre *A. fischeri* de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos 270
7.5.5 Ecotoxicidad de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos sobre comunidades microbianas acuáticas 274
7.5.5.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua 274
7.5.5.2 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas acuáticas 274
7.5.5.3 Efecto de las combinaciones en las comunidades bacterianas acuáticas: AWCD y CLPP 279
7.5.6 Comparación toxicidades SACTAs y antibióticos 294
Capítulo 8 Discusión general de resultados 297
8.1 Impacto ecotoxicológico y persistencia ambiental de los antibióticos 301
8.2 Evaluación del terpineol como agente antimicrobiano natural de interés terapéutico 307
8.3 Perfil ecotoxicológico del terpineol: implicaciones para su uso como alternativa antimicrobiana 310
8.4 Interacciones sinérgicas entre terpineol y antibióticos 313
8.5 Evaluación ecotoxicológica de combinaciones terapéuticas basadas en terpineol y antibióticos 318
8.6 Integración de eficacia clínica y seguridad ambiental en el enfoque *One Health* 322
8.7 Limitaciones de la investigación llevada a cabo 323
8.7.1 Limitaciones metodológicas 323
8.7.2 Limitaciones en la extrapolación ambiental 324
8.7.3 Limitaciones en la aplicabilidad clínica 324
8.7.4 Limitaciones en la generalización de los resultados 325
Capítulo 9 Futuras líneas de investigación 327

Capítulo 10 Conclusiones..... 333

Bibliografía 337

Anexos..... 399

Anexos BLOQUE I 401

Anexo 1.1: 401

Anexo 1.2: 419

Anexo 1.3 421

Anexos BLOQUE II 422

Anexo 2.1 422

Anexos BLOQUE III..... 440

Anexo 3.1 440

Anexo 3.2 464

Anexos BLOQUE V 465

Anexo 5.1 465

Anexo 5.2 491

Anexo I: 492

Índice de tablas

Tabla 1: Descubrimiento de los principales antibióticos convencionales. 10

Tabla 2: Regulaciones sobre el uso de antibióticos en ganadería en las distintas regiones del mundo 18

Tabla 3: Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos 25

Tabla 4: Concentraciones de antibióticos detectadas en ecosistemas acuáticos..... 30

Tabla 5: Concentraciones de antibióticos detectadas en ecosistemas terrestres 32

Tabla 6: Compuestos de origen natural con actividad antimicrobiana demostrada..... 42

Tabla 7: Comparativa entre diferentes alternativas a los antibióticos propuestas..... 58

Tabla 8: Principales propiedades de los productos naturales empleados..... 76

Tabla 9: Principales características de los antibióticos empleados 82

Tabla 10: Prioridad WHO y patogenicidad de las bacterias del estudio 84

Tabla 11: Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas empleadas..... 87

Tabla 12: Principales propiedades de los disolventes empleados..... 105

Tabla 13: Concentraciones de antibióticos empleadas en ensayos de toxicidad..... 125

Tabla 14: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para los antibióticos empleados sobre los indicadores seleccionados..... 127

Tabla 15: Parámetros cinéticos (Cmax y r) de las curvas de AWCD de microorganismos de río y suelo expuestos a los antibióticos evaluados. 156

Tabla 16: Concentraciones máximas de cada disolvente toreable por cada cepa bacteriana 166

Tabla 17: Solubilidad máxima de los productos naturales en cada uno de los disolventes 168

Tabla 18: MIC y MBC de los productos naturales solubles sobre las cepas bacterianas del estudio 170

Tabla 19: Cuantificación MICs bacterianas para cada producto natural 173

Tabla 20: MICs bibliográficas hidroquinona y terpineol sobre las bacterias seleccionadas 176

Tabla 21: MICs de los antibióticos sintéticos frente a las cepas bacterianas seleccionadas para esta investigación 179

Tabla 22: Concentraciones de productos naturales empleadas en ensayos de toxicidad 183

Tabla 23: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para los productos naturales empleados sobre los indicadores seleccionados 185

Tabla 24: Parámetros cinéticos (Cmax y r) de las curvas de AWCD de microorganismos de río y suelo expuestos a los productos naturales evaluados. 209

Tabla 25: Valores MIC y FICi de las combinaciones de TER y antibióticos 221

Tabla 26: Concentraciones de terpineol y antibióticos empleados en ensayos de toxicidad con organismos indicadores 251

Tabla 27: Concentraciones de SACTAs empleadas en ensayos de toxicidad con organismos indicadores 252

Tabla 28: Concentraciones de SACTAs empleadas en ensayos de toxicidad con comunidades microbianas 252

Tabla 29: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para el terpineol y los antibióticos empleados sobre los indicadores seleccionados 255

Tabla 30: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para las SACTAs empleadas sobre los indicadores seleccionados 259

Índice de figuras

Figura 1: Esperanza de vida de la población en distintas regiones del mundo 11

Figura 2: Consumo de antibióticos en DDD/1000 habitantes/día entre el año 2000 y 2018 12

Figura 3: Cambio en el consumo de antibióticos en DDD/1000 habitantes/día entre el año 2000 y 2015.....13

Figura 4: Cambio en el consumo de antibióticos en DDD/1000 habitantes/día entre los años 2016 y 2023 14

Figura 5: Consumo anual de antibióticos por Kilo de animal producido.....15

Figura 6: Principales mecanismos de transferencia horizontal de genes.....20

Figura 7: Vías de interconexión en el medio ambiente 23

Figura 8: Campaña PRAN 2024.....38

Figura 9: Duración y probabilidad de éxito de las fases de investigación de nuevos antibióticos.....40

Figura 10: Objetivos secundarios de la tesis doctoral.....64

Figura 11: Estructura química del ácido ferúlico 67

Figura 12: Estructura química del citronellal 68

Figura 13: Estructura química de la hidroquinona.....69

Figura 14: Estructura de la lisozima 70

Figura 15: Estructura química del mentol 71

Figura 16: Estructura química de la naringenina.....72

Figura 17: Estructura de la papaína 73

Figura 18: Estructura química de la quercetina 74

Figura 19: Estructura química del terpineol.....75

Figura 20: Representación método micro dilución 110

Figura 21: Representación método dilución tablero de ajedrez 113

Figura 22: Representación método diluciones seriadas 118

Figura 23: Toxicidad de los antibióticos sobre D. magna tras 24h de exposición 126

Figura 24: Toxicidad de los antibióticos sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición 131

Figura 25: Toxicidad de los antibióticos sobre A. cepa tras 72h de exposición.....135

Figura 26: Taxones más prevalentes de los microorganismos del río en cada nivel taxonómico.....140

Figura 27: Principales filos bacterianos en la muestra de río.....141

Figura 28: Taxones más prevalentes de los microorganismos del suelo en cada nivel taxonómico.....144

Figura 29: Principales filos bacterianos en la muestra de suelo.....145

Figura 30: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Oxitetraciclina 151

Figura 31: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Clortetraciclina 152

Figura 32: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Florfenicol.....153

Figura 33: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Neomicina 154

Figura 34: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Sulfadiazina 155

Figura 35: Toxicidad de los productos naturales sobre D. magna tras 24h de exposición 184

Figura 36: Toxicidad de los productos naturales sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición 188

Figura 37: Toxicidad de los productos naturales sobre E. fetida tras 7 días de exposición 191

Figura 38: Toxicidad de los productos naturales sobre A. cepa tras 72h de exposición 194

Figura 39: Taxones más prevalentes de los microorganismos del agua en cada nivel taxonómico..... 198

Figura 40: Principales filos bacterianos en la muestra de agua 199

Figura 41: Taxones más prevalentes de los microorganismos del suelo en cada nivel taxonómico..... 202

Figura 42: Principales filos bacterianos en la muestra de suelo..... 203

Figura 43: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Hidroquinona 207

Figura 44: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Terpineol..... 208

Figura 45: Isobologramas de las interacciones sinérgicas entre el terpineol y los antibióticos..... 224

Figura 46: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y gentamicina frente a S. agalactiae 227

Figura 47: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y gentamicina frente a A. baumannii..... 228

Figura 48: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y gentamicina frente a S. aureus 229

Figura 49: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y florfenicol frente a S. aureus 230

Figura 50: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y cloranfenicol frente a S. marcescens 231

Figura 51: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y tetraciclina frente a S. marcescens 232

Figura 52: Impacto de tratamientos individuales y combinados en la selección de resistencia antimicrobiana 240

Figura 53: Toxicidad del terpineol sobre D. magna tras 48h de exposición 253

Figura 54: Toxicidad de los antibióticos sobre D. magna tras 24 y 48h de exposición256

Figura 55: Toxicidad de las SACTAs sobre D. magna tras 24 y 48h de exposición 258

Figura 56: Comparación entre resultados experimentales y predicciones del modelo en curvas dosis-respuesta para D. magna 261

Figura 57: Toxicidad del cloranfenicol sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición 269

Figura 58: Toxicidad de las SACTAs sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición. 271

Figura 59: Comparación entre resultados experimentales y predicciones del modelo en curvas dosis-respuesta para A. fischeri 272

Figura 60: Taxones más prevalentes de los microorganismos del río en cada nivel taxonómico 275

Figura 61: Principales filos bacterianos en la muestra de río 276

Figura 62: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA1 281

Figura 63: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA2 282

Figura 64: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA3 283

Figura 65: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA4 284

Figura 66: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA5 285

Listado de Abreviaturas

AFE: Ácido ferúlico

AMO: Amoxicilina

AMP: Ampicilina

AMPs: *Antimicrobial Peptides* (Péptidos antimicrobianos)

ATCC: *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo)

AWCD: *Average Well Color Development* (Desarrollo promedio del color del pozo)

CA: *Concentration Addition* (adición de concentraciones)

CAL: Citronellal

CFU: Unidades formadoras de colonias

CHL: Cloranfenicol

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas)

CTC: Clortetraciclina

DDD: Dosis Diaria Definida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC_{50}: *Effective Concentration 50%* (concentración efectiva media)

ERY: Eritromicina

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana)

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos)

FF: Florfenicol

FICi: *Fractional Inhibitory Concentration index* (índice de concentración inhibitoria fraccional)

GTM: Gentamicina

HQ: Hidroquinona

HTS: *High-Throughput Screening* (cribado de alto rendimiento)

IA: *Independent Action* (Acción independiente)

LC_{50}: *Lethal Concentration 50%* (concentración letal media)

LS: Lisozima

MBC: *Minimum Bactericidal Concentration* (Concentración mínima bactericida)

MIC: *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentración mínima inhibitoria)

MTL: Mentol

NAR: Naringenina

NMC: Neomicina

OTC: Oxitetraciclina

PAP: Papaína

PENG: Penicilina G

QCT: Quercetina

SACTAs: *Synergistic Antimicrobial Combinations of TER and Antibiotics* (combinaciones antimicrobianas sinérgicas de TER y antibióticos)

STM: Estreptomicina

SDZ: Sulfadiazina

T20: Tween 20™

T80: Tween 80™

TC: Tetraciclina

TER: Terpineol

UE: Unión Europea

WHO: *World Heatl Organization* (Organización mundial de la salud)

WOAH: *World Organisation for Animal Health* (Organización Mundial de Sanidad Animal)

Capítulo 1
Introducción

1.1 Visión global de la tesis realizada

En la presente tesis doctoral se presentan los resultados obtenidos al tratar de desarrollar estrategias innovadoras y sostenibles que permitan complementar el empleo actual de antibióticos de síntesis. Esta investigación busca contribuir a solucionar uno de los problemas más importantes de la salud pública actual: la creciente ineficacia de los tratamientos antibióticos debido a la diseminación de resistencias bacterianas.

La investigación se engloba en un contexto global marcado por uso indiscriminado y, en numerosas ocasiones, abusivo de los antibióticos. Estas prácticas han desembocado en problemas transcendentales como es la acelerada generación de resistencias frente a los antimicrobianos. Estas resistencias representan una seria amenaza para la salud pública a nivel mundial al comprometer la eficacia de los tratamientos fundamentales frente a las infecciones bacterianas. Este comportamiento no solo aparece en prácticas médicas inadecuadas, sino también en otros sectores como la ganadería y la agricultura. En este escenario, el uso intensivo de antibióticos en la ganadería aparece como una de las principales causas agravantes del problema, debido a la acumulación de estos compuestos en los ecosistemas lo que favorece la diseminación de resistencias en entornos naturales.

El trabajo realizado se ha centrado en identificar y evaluar productos de origen natural que puedan actuar como alternativas a estos antibióticos sintéticos. Para ello se ha llevado a cabo una investigación exhaustiva desde un punto de vista multidisciplinar en el que se han combinado aspectos tanto microbiológicos como medioambientales.

El primer paso de este proyecto consistió en la selección de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales, tales como extractos vegetales, metabolitos secundarios de microorganismos y otras moléculas derivadas. Estos compuestos fueron sometidos a análisis rigurosos para evaluar su eficacia frente a una amplia gama de bacterias patógenas, empleando metodologías estandarizadas de susceptibilidad *in vitro*. Los resultados obtenidos permitieron identificar a aquellos compuestos con mayor potencial antibacteriano. Posteriormente, se evaluó la capacidad que estos productos tienen en la generación de resistencias empleando para ello experimentos basados en la evolución y la supervivencia adaptativa simulando escenarios de exposición prolongada a estos compuestos. Esto permitió evaluar no solo

la eficacia inicial de los productos seleccionados, sino también su sostenibilidad a lo largo del tiempo sobre poblaciones bacterianas en evolución.

Paralelamente, otro aspecto clave que se ha abordado en esta investigación ha sido el análisis impacto ambiental de estas alternativas, para lo cual se llevaron a cabo estudios de ecotoxicidad. Éstos incluyeron ensayos con modelos biológicos complejos, incluyendo tanto seres biológicos pluricelulares como comunidades bacterianas naturales. Estos estudios se diseñaron para evaluar los posibles efectos adversos de los compuestos en organismos no objetivo, así como su influencia en el equilibrio ecológico de los entornos en los que podrían acabar una vez sean empleados.

Los resultados obtenidos en estas dos líneas de trabajo han permitido generar una visión integral de las alternativas propuestas. Este enfoque va más allá de la evaluación convencional de alternativas a los antibióticos, que generalmente se limita a la búsqueda de compuestos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano. A diferencia de estas aproximaciones tradicionales, la presente tesis incorpora una perspectiva ambiental y evolutiva, con el objetivo de garantizar que las soluciones propuestas sean no solo efectivas, sino también sostenibles desde el punto de vista ecológico.

Para concluir esta introducción, cabe señalar que la presente tesis pretende aportar al desarrollo de estrategias terapéuticas que resulten no solo eficaces frente a bacterias patógenas, sino también sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Los resultados aquí presentados ponen de relieve la necesidad de que la comunidad científica adopte un enfoque multidisciplinar e integrador para afrontar el desafío que representa la resistencia a los antibióticos y, con ello, salvaguardar la salud pública a nivel global.

1.2 Lista de artículos científicos

A raíz del trabajo realizado en esta tesis se han elaborado los siguientes artículos científicos que se encuentran publicados en revistas científicas internacionales indexadas:

Pino-Otín, M., Valenzuela, A., Gan, C., Lorca, G., Ferrando, N., Langa, E., Ballestero, D., 2024. Ecotoxicity of five veterinary antibiotics on indicator organisms and water and soil communities. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 274. (Q1, Factor de Impacto: 6.1)

Valenzuela, A., Ballestero, D., Gan, C., Lorca, G., Langa, E., Pino-Otín, M., 2024. Hydroquinone Ecotoxicity: Unveiling Risks in Soil and River Ecosystems with Insights into Microbial Resilience. TOXICS 12. (Q1, Factor de Impacto: 4.1).

Valenzuela, A., Gan, C., Ferrando, N., Langa, E., Ballestero, D., Pino-Otín, M. Terpineol Enhances Antibiotic Effectiveness and Reduces Resistance in Clinically Relevant Bacteria. HELIYON 11. (Q1, Factor de impacto: 3.6)

Valenzuela, A., Ballestero, D., Gan, C., Lorca, G., Langa, E., Pino-Otín, M., Synergistic Antimicrobial Combinations of Terpineol and Antibiotics: a safe alternative for the freshwater environment? STOTEN. (Submitted)

En el Anexo I se recogen los méritos adicionales derivados del trabajo realizado en esta tesis doctoral.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Orígenes de la terapia antimicrobiana

El uso de sustancias con propiedades antimicrobianas empleadas para prevenir y tratar enfermedades se remonta a milenios atrás. Diversas civilizaciones, como las de China, Grecia y Egipto, aplicaban cataplasmas de pan mohoso sobre heridas abiertas hace más de 2000 años para combatir infecciones y acelerar la cicatrización basándose en observaciones empíricas de efectividad (Hutchings, Truman and Wilkinson 2019). Estas y otras prácticas similares se encuentran recogidas en textos médicos antiguos, como en el "*Papiro de Ebers"*, datado en el año 1550 a.C. En este manuscrito se describe el empleo de pan mohoso y tierra medicinal como parte de los tratamientos utilizados para tratar distintas infecciones (Haas 1999). Estas observaciones tempranas sobre la capacidad de ciertos compuestos para inhibir microorganismos sentaron las bases de la futura búsqueda científica de agentes antimicrobianos (Gould 2016).

El verdadero desarrollo de los fármacos antiinfecciosos comenzó a inicios del siglo XX con Paul Ehrlich, quien formuló el concepto de quimioterapia y creó los primeros tratamientos eficaces frente a infecciones bacterianas, como Salvarsán (1909) y Neo-Salvarsán (1912), sintetizados a partir de arsénico (Sahu and Khare 2023). Estos fármacos fueron los primeros tratamientos efectivos contra la sífilis, una enfermedad causada por *Treponema pallidum* (Gelpi, Gilbertson and Tucker 2015). Como consecuencia de estas investigaciones, tuvo lugar una transformación en el ámbito de la terapia antimicrobiana, marcando un punto de inflexión en la lucha frente a las enfermedades infecciosas. Un acontecimiento determinante en esta evolución fue el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 (Fleming 1928), resultado de la observación fortuita del efecto inhibitorio del hongo *Penicillium notatum* sobre *Staphylococcus aureus* (Durand, Raoult and Dubourg 2019).

En las décadas posteriores, tuvo lugar un período de intensa innovación científica en el campo de la terapia antimicrobiana, comúnmente denominado la *"era dorada de los antibióticos"* (Aminov 2010). Durante esta etapa, se lograron avances significativos que transformaron de manera radical la medicina moderna, permitiendo el tratamiento efectivo de un amplio espectro de enfermedades infecciosas y reduciendo sustancialmente la morbilidad y mortalidad asociadas a estas patologías (Muteeb et al. 2023).

Los principales hitos de esta revolución científica se presentan en la Tabla 1, donde se sintetizan los descubrimientos más relevantes junto con su origen. Un análisis detallado de estos hallazgos revela que la mayoría de los antibióticos identificados durante este período derivan de *Actinobacterias* del género *Streptomyces,* resultado de la intensa competencia ecológica que mantienen con otras bacterias y microorganismos en su entorno natural (Embley and Stackebrandt 1994).

Tabla 1: Descubrimiento de los principales antibióticos convencionales.

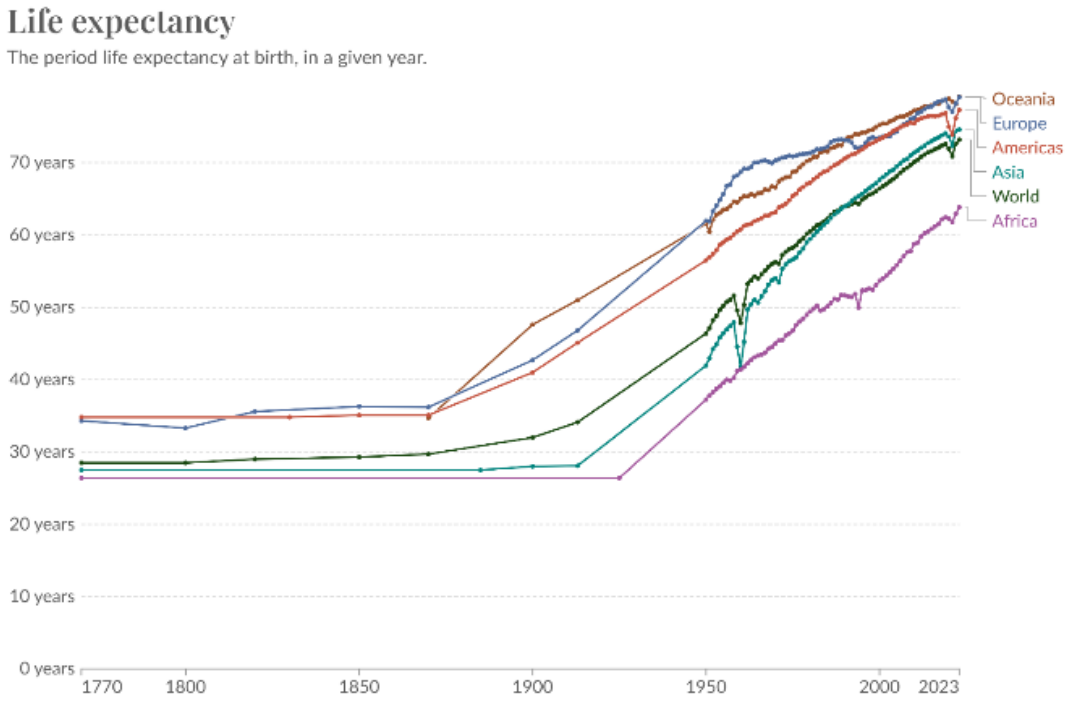
Antibiótico	Año descubierto	Origen
Penicilina	1928	*Penicillium notatum*
Estreptomicina	1943	*Streptomyces griseus*
Cloranfenicol	1946	*Streptomyces venezuelae*
Eritromicina	1948	*Streptomyces erythraeus*
Cefalosporina	1948	*Cephalosporium acremonium*
Clortetraciclina	1948	*Streptomyces aureofacien*
Neomicina	1949	*Streptomyces fradiae*
Vancomicina	1953	*Amycolatopsis orientali*
Rifampicina	1957	*Streptomyces mediterranei*
Metronidazol	1960	*Streptomyces sp.*
Norfloxacino	1961	Sintético
Ácido fusídico	1962	*Fusidium coccineum*
Gentamicina	1963	*Micromonospora purpurea*
Lincomicnina	1963	*Streptomyces lincolnensis*
Tobramicina	1967	*Streptomyces tenebrarius*
Fosfomicina	1969	*Streptomyces fradiae*
Carbapenem	1976	*Streptomyces cattleya*
Linezolid	1987	Sintético

Elaboración propia. Fuente: (Durand et al. 2019).

Además de su utilidad directa en la eliminación de infecciones, los antibióticos tienen un papel fundamental en el desarrollo que ha tenido lugar en otros muchos campos médicos durante el último siglo. Su impacto ha sido decisivo, por ejemplo, en los trasplantes de órganos, donde permiten prevenir y controlar infecciones oportunistas que puedan sufrir los pacientes inmunodeprimidos, lo que aumenta las tasas de éxito de este tipo de procedimientos. Del mismo modo, en el ámbito quirúrgico, el empleo de antibióticos ha revolucionado la seguridad de las intervenciones al reducir las complicaciones debidas a la presencia de sobreinfecciones permitiendo así la realización segura de cirugías más complejas (Katz and Baltz 2016).

Con todo ello, el empleo de los antibióticos ha contribuido a mejorar las expectativas de vida y reducir significativamente las tasas de mortalidad en todo el mundo (Alharbi et al. 2014) como se muestra en la figura 1, donde aparece un claro cambio de tendencia en el siglo XX, momento en el cual tiene lugar su aparición y empleo generalizado.

Figura 1: Esperanza de vida de la población en distintas regiones del mundo



Elaborado por Our World in Data. Fuente: (Saloni et al. 2023).

No obstante, los elevados beneficios del empleo de los antibióticos también han traído consigo la aparición de patrones de uso excesivo tanto en medicina humana como

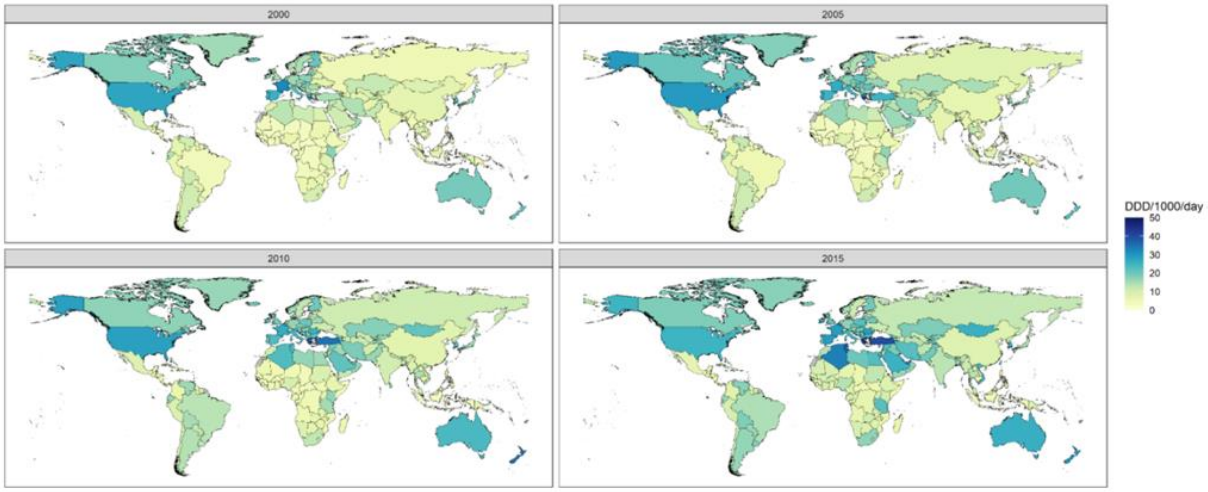
en veterinaria. En el ámbito humano, los antibióticos son prescritos en numerosas ocasiones frente a enfermedades cuya causa no es una infección bacteriana como por ejemplo los resfriados o las gripes de origen vírico; o son empleados de forma incorrecta interrumpiendo los tratamientos antes de completarlos al experimentar una mejoría temprana por parte de los pacientes (Dache, Dona and Ejeso 2021, Xavier et al. 2022, Sijbom et al. 2023). Por otra parte, en el sector veterinario los antibióticos no sólo se emplean para tratar infecciones en animales enfermos; en ganadería, se emplean también como promotores del crecimiento en animales de granja, lo que ha contribuido a incrementar su utilización en todo el mundo (Martin, Thottathil and Newman 2015, Mugwaneza et al. 2024).

2.1.1 El uso global de antibióticos humanos: Una tendencia en aumento

Durante los últimos años la comunidad científica ha llevado a cabo numerosas investigaciones para analizar las tendencias en el uso de antibiótico en la práctica clínica:

Un estudio publicado en el año 2021 analizó el consumo de antibióticos en niños menores de 5 años pertenecientes a 204 países entre los años 2000 y 2018. Los hallazgos revelaron que la tasa global de consumo de antibiótico aumentó de 9.8 (9.2-10.5) dosis diarias definidas (DDD) por 1000 habitantes por día en el año 2000 a 14.3 (13.2-15.6) en el año 2018, lo que representa un incremento del 46%. Este incremento se acentúa aún más al tener en cuenta únicamente a países en vías de desarrollo (Browne et al. 2021) . La figura 2 resalta los resultados de este artículo:

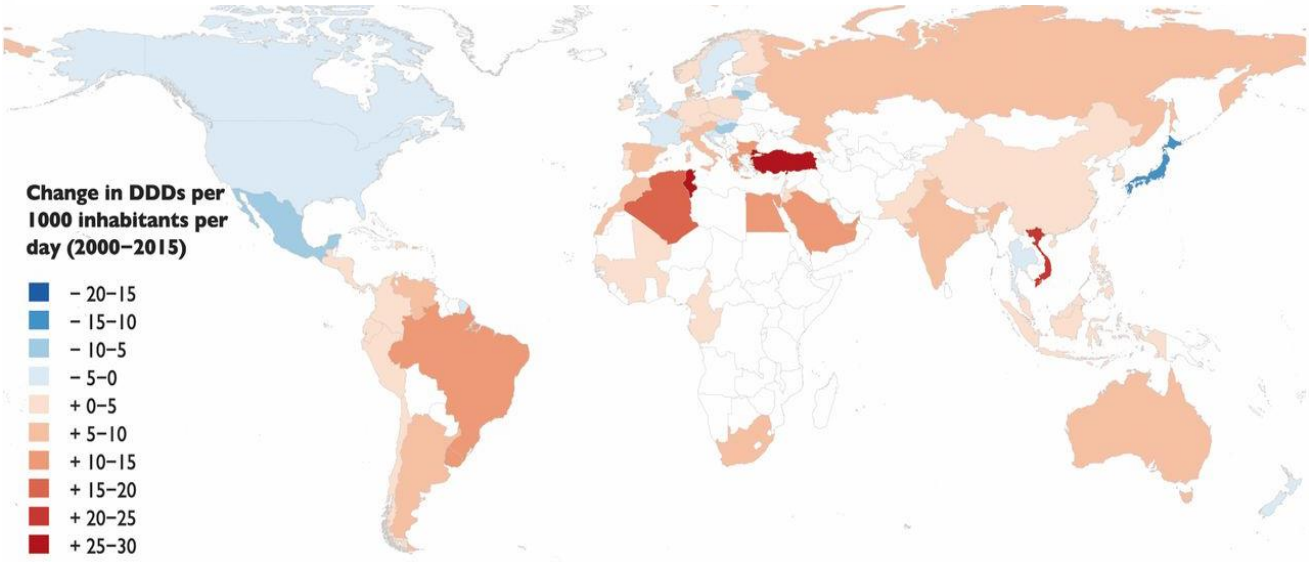
Figura 2: Consumo de antibióticos en DDD/1000 habitantes/día entre el año 2000 y 2018



Fuente: (Browne et al. 2021)

Estos resultados concuerdan con otra investigación llevada a cabo en el año 2018 en la que analizaron las tendencias de consumo de antibiótico en 76 países agrupados según su nivel de desarrollo. Los resultados de este estudio muestran un incremento del 39% en el consumo de antibiótico medido en DDD por 1000 habitantes por día entre los años 2000 y 2015. Pese a que en los países desarrollados se observa un descenso del 4% en DDD por 1000 habitantes por día, el incremento registrado en los países en vías de desarrollo impulsa a un aumento en el consumo global (Klein et al. 2018). La figura 3 resume los resultados de este artículo:

Figura 3: Cambio en el consumo de antibióticos en DDD/1000 habitantes/día entre el año 2000 y 2015

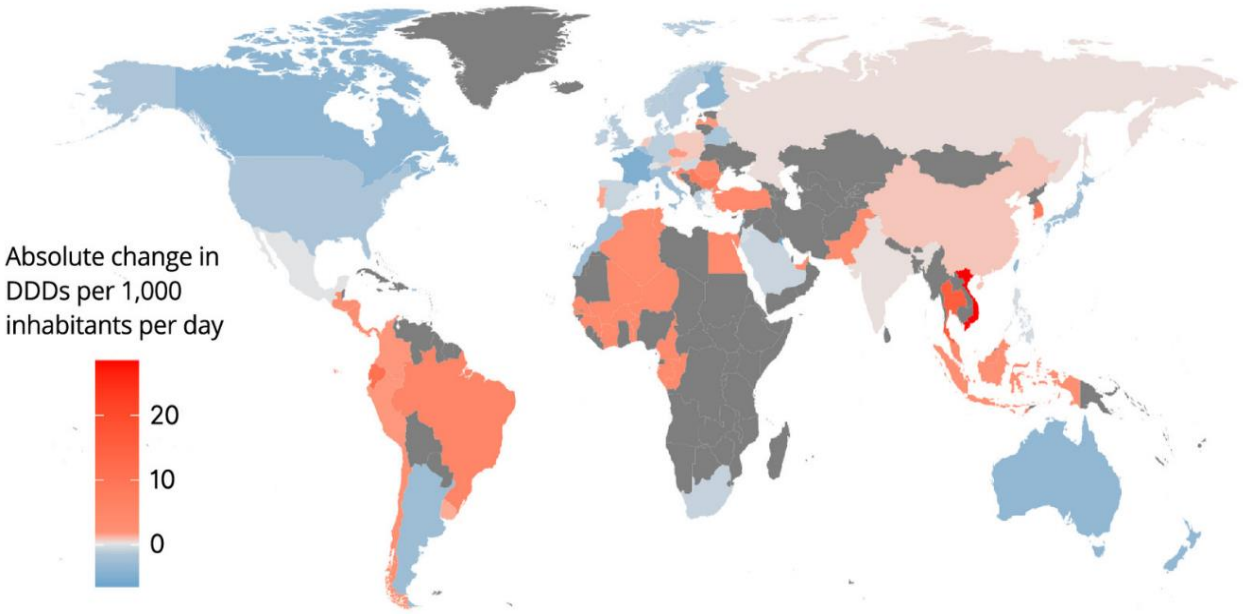


Fuente: (Klein et al. 2018)

Más recientemente, otro estudio llevado a cabo de por el mismo grupo de investigadores en el año 2024, analizó las tendencias de consumo de antibióticos en 67 países entre los años 2016 y 2023, revelando un incremento del 10.6% en el consumo de antibiótico creciendo desde los 13.7 hasta los 15.2 DDD por 1000 habitantes por día en ese periodo de tiempo. Al igual que en los estudios previos, se observan diferencias de tendencia entre los países desarrollados y aquellos que se encuentran en vías de desarrollo. Este ligero aumento se acentúa al tener en cuenta el incremento exponencial que ha experimentado la población mundial en el periodo de años estudiado, lo que ocasiona un aumento absoluto del 16.3% de DDD llegando a las 34.3 miles de millones de DDD. En este estudio se proyecta que, de continuar la tendencia actual, el consumo global alcanzará los 75.1 mil millones de DDD para 2030, impulsado principalmente por el crecimiento en países de ingresos medios y bajos (Klein et al. 2024). La figura 4

destaca los principales hallazgos de esta investigación, destacando las diferencias en los patrones de uso entre países con distintos niveles de desarrollo económico.

Figura 4: Cambio en el consumo de antibióticos en DDD/1000 habitantes/día entre los años 2016 y 2023



Fuente: (Klein et al. 2024)

Los estudios revisados evidencian un continuo crecimiento en el consumo global de antibiótico impulsado en gran medida por los cambios experimentados en los países en vías de desarrollo donde el acceso a este tipo de tratamientos ha mejorado en las últimas décadas. Una posible causa de este aumento se encuentra en las diferencias en el acceso a estos antibióticos. Mientras que en Europa y Norteamérica su distribución se encuentra estrictamente regulada, en otros países de ingresos medios y bajos de Sudamérica, Asia y África, estos tratamientos están disponibles sin necesidad de la prescripción médica lo que facilita su acceso y fomenta un uso descontrolado (Melles-Brewer et al. 2024, Llor, Benkő and Bjerrum 2024).

Esta tendencia muestra que en ausencia de medidas estratégicas concretas el consumo de antibiótico seguirá en aumento, lo que podría tener consecuencias negativas para la salud pública mundial, ya que, como se detallará en los apartados siguientes, el uso de los antibióticos trae consigo repercusiones adversas tanto para la salud humana como para el medioambiente.

2.1.2 El uso global de antibióticos veterinarios: Una regulación desigual

Aunque los métodos de obtención de los datos son distintos entre los países, se calcula que más de la mitad de los antibióticos producidos en el mundo se destinan al sector veterinario, principalmente para su administración a animales de granja (Van Boeckel et al. 2019). Los datos se cifran en un consumo anual por kilo de animal producido de 172 mg/Kg de cerdo, 148 mg/Kg de pollo y 45 mg/Kg de vacuno (Oliver et al. 2020). Además, se espera que se produzca un aumento en el consumo global partiendo de las 63151 toneladas en el año 2010 hasta las 105596 toneladas en el año 2030 (Van Boeckel et al. 2015). La figura 5 representa las cifras de consumo anual por kilo de animal producido.

Figura 5: Consumo anual de antibióticos por Kilo de animal producido

Elaboración propia. Fuente: (Oliver et al. 2020).

Este consumo masivo de antibiótico veterinarios es reflejo de la creciente demanda de alimentos de origen animal, impulsado por diversos factores. Destacan entre ellos el crecimiento exponencial de la población mundial, que genera una cada vez mayor necesidad de proteínas animales para satisfacer las necesidades nutricionales. A ello hay que sumar la urbanización de la población que ha concentrado a la mayor parte de los seres humanos en ciudades donde no se producen alimentos, requiriendo la creación de macro granjas para abastecerlos; y los cambios en las preferencias alimentarias, asociados en muchas ocasiones a una mejora en el nivel de vida que ha contribuido a que el consumo de carne, lácteos y otros derivados animales se conviertan en parte fundamental de la dieta diaria en numerosas regiones del mundo (de Bruin, Dengerink and van Vliet 2021, Miller et al. 2022).

Para poder responder a esta demanda, el sector ganadero ha adoptado diversas estrategias cuyo objetivo ha sido optimizar la producción para así conseguir garantizar el suministro. Una de las prácticas más extendidas ha sido la de emplear antibióticos en los animales de granja no solo para tratar enfermedades y evitar las pérdidas productivas, sino también como promotores del crecimiento (Collignon et al. 2005). Esto se basa en la capacidad de ciertos antibióticos de mejorar la eficiencia de absorción de los nutrientes consiguiendo un mayor rendimiento de los mismos en términos del desarrollo del ganado (Butaye, Devriese Luc and Haesebrouck 2003).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) se muestran en contra de este empleo de antibiótico a modo de promotores del crecimiento en la ganadería. Ambas organizaciones recomiendan que los antibióticos se empleen únicamente para tratar las posibles enfermedades que puedan sufrir los animales y siempre bajo supervisión veterinaria (Aidara-Kane et al. 2018, Aslam et al. 2021). En línea con esta postura, tanto la WHO como la FAO han instado a los gobiernos de todo el mundo a que desarrollen leyes que prohíban el uso de antibiótico veterinarios con fines no terapéuticos, sin embargo, la implementación de estas recomendaciones ha dado lugar a resultados desiguales en las distintas regiones del mundo (Kirchhelle 2018).

En los países desarrollados, las recomendaciones de las agencias han sido traducidas en políticas regulatorias que han llevado a una disminución del uso de antibióticos, especialmente como promotores del crecimiento (Founou, Founou and Essack 2016).

La Unión Europea (UE) prohibió el empleo de estos compuestos como promotores del crecimiento en el año 2006 (Reglamento CE n.º 1831/2003) y en 2022 actualizó la legislación restringiendo aún más el empleo de antibiótico en animales especialmente como profilácticos a casos excepcionales donde el riesgo de enfermedad sea muy elevado (Reglamento UE 2019/6). Esta última regulación fue transpuesta en la legislación de nuestro país en un Real Decreto por el cual se refuerza la vigilancia del uso de antibióticos en especies ganaderas regulando un método de cálculo de uso habitual de antibióticos para favorecer un uso sostenible de los mismos (Real Decreto 992/2022).

En otras zonas desarrolladas del mundo como Norteamérica la adopción de estas medidas fue más tardía. La prohibición de emplear antibiótico para mejorar la eficiencia productiva de la ganadería no fue efectiva hasta el año 2017 en Estados Unidos a raíz de la Veterinary Feed Directive implementada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (FDA 2017) en la que se exige prescripción veterinaria para el empleo de cualquier antibiótico en animales (AccessScience 2017). El año siguiente, en Canadá también se prohíbe este empleo de antibióticos como promotores del crecimiento en animales destinados a la producción de alimentos (Health Canada 2018).

De manera similar, en países de Oceanía, especialmente Australia y Nueva Zelanda, también han implementado normas que prohíben este tipo de utilización de los antibióticos con el objetivo de reducir el uso de los mismos (Australia's National Antimicrobial Resistance Strategy 2019, Ministry for Primary Industries, New Zealand Goverment 2021).

En los países asiáticos las regulaciones varían significativamente entre naciones. Aunque algunos de ellos han comenzado recientemente a adoptar medidas que prohíban el empleo de antibiótico como promotores del crecimiento, en términos generales, estas medidas suelen ser menos estrictas que las adoptadas en Europa y Norteamérica (Malik et al. 2023). Entre las medidas adoptadas destaca la prohibición del empleo de colistina como promotor del crecimiento en China desde el año 2016 (Walsh and Wu 2016) y la publicación ese mismo año del Plan Nacional en Resistencias Antimicrobianas por parte de las autoridades japonesas en el que se limita el empleo de los antibióticos en animales (Kusama et al. 2021).

En países en vías de desarrollo situados en los continentes de Sudamérica y África las regulaciones sobre este uso de antibiótico en animales se encuentran menos avanzadas. Aunque la legislación existe en muchos de estos países, la capacidad para aplicar y hacer cumplir estas normativas es muy limitada, lo que dificulta su efectividad. A esta situación hay que sumar el rápido crecimiento económico y demográfico que están experimentando estas regiones, lo que impulsa una creciente demanda de proteínas animales, lo que se traduce en un uso intensivo de antibiótico veterinarios, dificultando aún más los esfuerzos realizados para reducir su empleo (Manyi-Loh et al. 2018, Ayukekbong, Ntemgwa and Atabe 2017). Pese a ello existen regulaciones limitadas como la prohibición del empleo de colistina como promotor del crecimiento desde el año 2018

en Brasil y 2019 en Argentina (Rhouma, Madec and Laxminarayan 2023) y un plan nacional de reducción del empleo de estos compuestos en Sudáfrica (Van et al. 2020).

La tabla 2 resume los principales aspectos regulatorios sobre el uso de antibiótico en ganadería:

Tabla 2: Regulaciones sobre el uso de antibióticos en ganadería en las distintas regiones del mundo

Región	Políticas y regulaciones	Información adicional/ Legislación Específica
Europa	Prohibición del uso de antibiótico como promotores del crecimiento desde 2006	Reglamento (CE) n.º 1831/2003: Prohíbe el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en piensos.
	En 2022 se actualizó la legislación, limitando el uso de antibiótico en profilaxis a casos excepcionales	Reglamento (UE) 2019/6: Prohíbe el uso rutinario de antibióticos en animales sanos y limita su uso preventivo a situaciones concretas.
	España (2022): Se refuerza la vigilancia del uso de antibióticos en especies ganaderas	Real Decreto 992/2022: Transpone la norma europea del Reglamento (UE) 2019/6
Norteamérica	Prohibición del empleo de antibióticos para promover el crecimiento a partir del año 2017 en Estados Unidos y del año 2018 en Canadá	Estados Unidos exige desde 2017 prescripción veterinaria para el empleo de antibióticos. Canadá: Health Canada prohibió en 2018 los antibiótico como promotores del crecimiento en animales destinados a la producción de alimentos.
Oceanía	Australia y Nueva Zelanda prohíben el uso de antibiótico como promotores del crecimiento.	Australia's National Antimicrobial Resistance Strategy y Ministry for Primary Industries Guidelines: Limita el uso de antibiótico en animales, especialmente los críticos para la medicina humana.
Asia	Regulaciones variables. Algunos países han prohibido el uso de antibiótico como promotores del crecimiento	China: Prohibió el uso de colistina en alimentación animal en 2016 (Walsh and Wu 2016). Japón: Ha comenzado a restringir el uso de ciertos antibióticos de importancia crítica (Kusama et al. 2021).
Sudamérica y África	Regulaciones menos avanzadas. Legislación existente con aplicación limitada. El crecimiento económico impulsa una mayor demanda de proteínas, intensificando el uso de antibiótico en ganadería.	Brasil y Argentina: Prohibieron el uso de colistina como promotor del crecimiento en el año 2018 y 2019 respectivamente (Rhouma et al. 2023). Sudáfrica: Regulaciones en desarrollo nacional (Van et al. 2020).

Elaboración propia. Varias fuentes.

2.2 Repercusiones negativas del empleo de los antibióticos

El empleo de antibiótico, aunque esencial para combatir enfermedades infecciosas, está directamente vinculado a la aparición de dos consecuencias negativas graves: la resistencia antimicrobiana y su presencia en el medio ambiente.

2.2.1 Resistencia antimicrobiana

Cada vez que se administra un antibiótico, este actúa eliminando las bacterias sensibles al fármaco. Sin embargo, en toda población bacteriana existen, de forma natural, variantes genéticas que confieren cierto grado de resistencia al antibiótico. Estas variantes, inicialmente minoritarias, encuentran un entorno favorable cuando el fármaco elimina a sus competidores susceptibles. Este proceso de presión selectiva permite que las bacterias resistentes se reproduzcan y proliferen, transmitiendo potencialmente sus genes de resistencia a las generaciones futuras (Muteeb et al. 2023).

Con el paso del tiempo, estas bacterias resistentes que un principio eran minoritarias acaban por convertirse en las predominantes, dando lugar a nuevas poblaciones que no son controladas por el mismo antibiótico que anteriormente resultaba eficaz (Solanki and Kumar Das 2024).

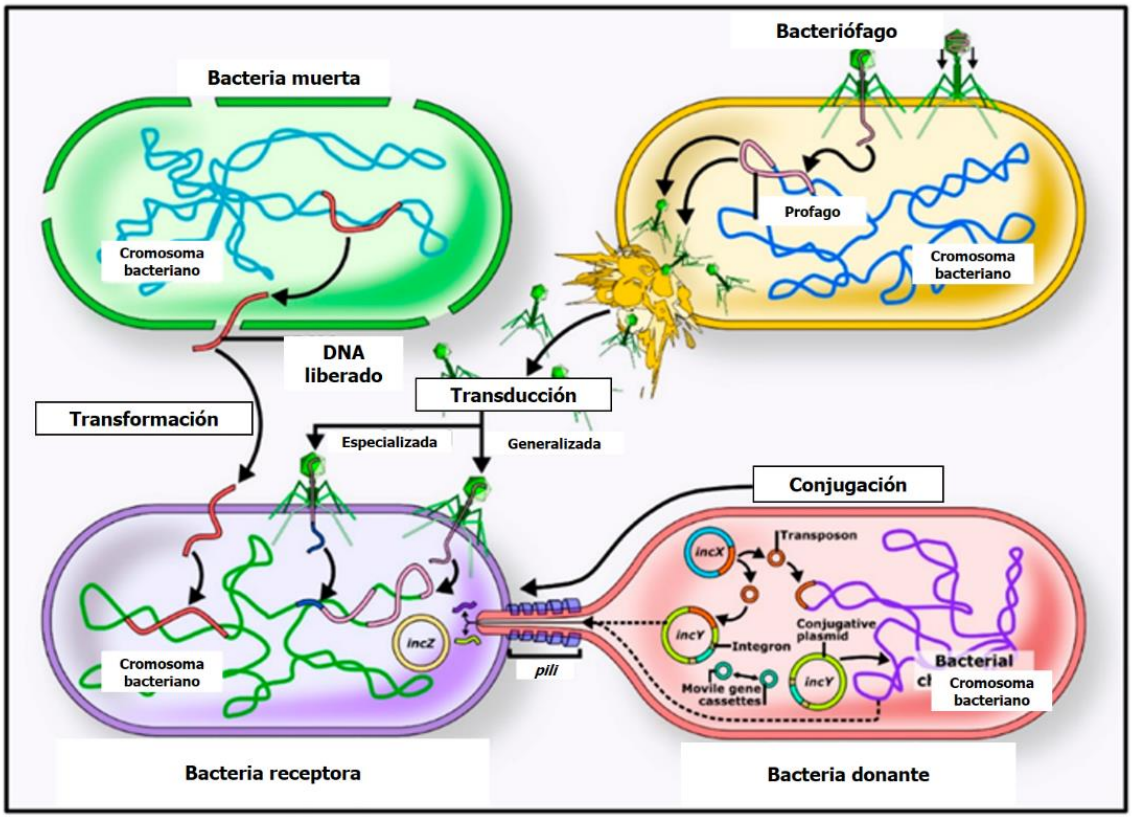
Este proceso no solo ocurre entre descendientes de la propia especie bacteriana tratada, sino que se puede extender a otras especies ampliando el alcance de la resistencia (Colomer-Lluch, Jofre and Muniesa 2011). A diferencia de la transferencia vertical, donde los genes pasan de una generación a otra a través de la replicación celular, la transferencia horizontal produce una diseminación de genes de resistencia entre diferentes especies bacterianas a través de varios mecanismos (Bello-López et al. 2019, von Wintersdorff et al. 2016):

Uno de estos mecanismos es la transformación, que ocurre cuando una bacteria es capaz de captar fragmentos de ADN libre conteniendo genes de resistencia presentes en el ambiente. Este ADN suele provenir de otras bacterias que han muerto y liberado su material genético al medio. Sin embargo, no todas las bacterias son competentes para realizar este proceso de manera natural.

Otro mecanismo altamente eficiente es la conjugación, que implica el contacto directo entre dos bacterias a través de una estructura especializada denominada pili. A través de este puente de conexión no solo se transfieren plásmidos, sino que en determinadas circunstancias también pueden movilizarse regiones cromosómicas. En estos casos, el plásmido de tipo F (factor F) se integra al cromosoma del donador (formando lo que se conoce como cepa Hfr), de modo que al iniciarse la transferencia el plásmido arrastra consigo segmentos del ADN cromosómico adyacente al punto de integración (Virolle et al. 2020). Este proceso amplifica de manera significativa el potencial de diseminación de genes, incluidos aquellos asociados a la resistencia a los antibióticos

Por último, la transducción es un mecanismo que involucra la participación de bacteriófagos, virus especializados en infectar bacterias. Durante su ciclo de replicación, estos virus pueden capturar fragmentos de ADN bacteriano que contienen genes de resistencia y transferirlos a otras bacterias al infectarlas. Este proceso facilita la dispersión de genes de resistencia en poblaciones bacterianas sin necesidad de contacto directo entre ellas. La figura 6 representa estos mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias:

Figura 6: Principales mecanismos de transferencia horizontal de genes



Modificado de Bello-López et al. Fuente:(Bello-López et al. 2019).

El uso indebido de los antibióticos contribuye a acelerar el proceso de generación de resistencias cuando éstos no eliminan completamente a las bacterias ejerciendo presión selectiva sobre ellas (Ventola 2015).

En medicina humana, estos malos hábitos de empleo de antibiótico se dan principalmente en la práctica de la automedicación. Completar el tratamiento antibiótico es fundamental para asegurar la total eliminación de las bacterias, sin embargo, es común que los pacientes suspendan la toma de un antibiótico cuando los síntomas de la enfermedad desaparecen creyendo que la infección ha sido erradicada. De esta forma las bacterias que de manera natural son más resistentes logran sobrevivir y multiplicarse, provocando una recaída en la enfermedad, pero esta vez con una población bacteriana más resistente al antibiótico que la original (Ocan et al. 2015).

Otro motivo de aparición de resistencias por un mal uso de los antibióticos por parte de los pacientes es su empleo en enfermedades en las que la causa no es una bacteria (Zawahir et al. 2022). Esto no solo es ineficaz para tratar la enfermedad, sino que también genera presión selectiva sobre las bacterias presentes en la microbiota, eliminando a las bacterias sensibles y permitiendo a las resistentes multiplicarse sin competencia pudiendo dar lugar a infecciones oportunistas (Ramirez et al. 2020).

El uso inapropiado de antibiótico no es exclusivo de países en vías de desarrollo donde no son de prescripción médica obligatoria, sino que también pueden darse en países con regulaciones más avanzadas por la reutilización de tratamientos previos por parte de los pacientes o por errores en la prescripción por parte de los médicos. Entre estos errores médicos pueden aparecer la prescripción a dosis insuficientes o con ajustes de dosis incorrectos en pacientes con condiciones especiales como obesos o de edad avanzada. Del mismo modo que en los casos anteriores, este empleo puede crear condiciones favorables para la multiplicación de bacterias resistentes, dando lugar a infecciones más difíciles de tratar (Loo et al. 2019, Hsu et al. 2008).

El problema de la generación de resistencias no es exclusivo a la medicina humana, también representa una creciente preocupación en la producción animal, especialmente en los sistemas de ganadería intensiva. En estos entornos, los animales son criados en condiciones de alta densidad poblacional, lo que facilita la propagación de enfermedades infecciosas. Para tratar de minimizar el riesgo de brotes infecciosos es frecuente que los antibióticos se empleen de manera profiláctica administrándolos a

animales sanos con el fin de evitar la enfermedad (Bengtsson and Greko 2014). Esta práctica permite reducir las pérdidas animales aumentando la productividad de las explotaciones ganaderas, pero a largo plazo contribuye a la selección de bacterias resistentes (Ma et al. 2021) que se propagan con facilidad en estos entornos ganaderos con alta concentración de animales (Karwowska 2024).

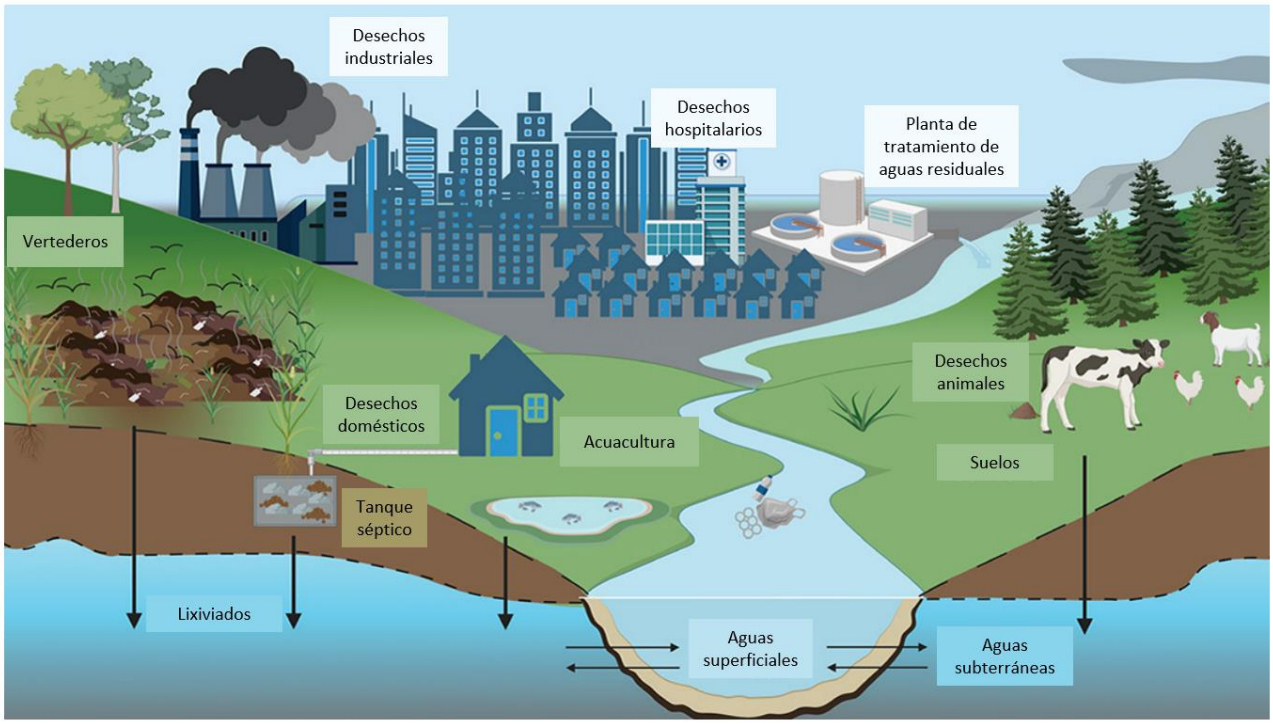
Este tipo de bacterias resistentes, al igual que el resto de bacterias presentes en las instalaciones de producción ganadera, no solo se diseminan entre los animales, sino que también pueden contaminar el medioambiente y llegar a otros animales o los propios seres humanos a través de varios mecanismos (Caneschi et al. 2023).

El primero de ellos es la transmisión directa de bacterias resistentes a través de la ingesta de alimentos contaminados. Durante la producción de productos de origen animal las bacterias presentes en los animales de origen pueden contaminar los alimentos si no se aplican correctamente medidas de higiene y de control de calidad. Si los productos se exponen a equipos o instrumentos contaminados las bacterias pueden transmitirse entre productos de distinto origen dando lugar a una contaminación cruzada. Posteriormente, si las técnicas de almacenamiento no son las adecuadas las bacterias también pueden mantenerse activas; por ejemplo, una mala refrigeración de los productos puede ocasionar que las bacterias resistentes proliferen. Finalmente, ciertas prácticas de cocinado de los alimentos en las que no se alcanza la temperatura suficiente para la cocción completa puede incrementar el riesgo de transmisión de cepas bacterianas resistentes al no eliminar a los patógenos permitiendo que lleguen al consumidor (Antunes, Novais and Peixe 2020, Aarestrup, Wegener and Collignon 2008).

Otro mecanismo de transmisión es la exposición a las bacterias resistentes por parte de trabajadores que interactúen estrechamente con los animales como pueden ser los ganaderos o los veterinarios. Este contacto continuo facilita la transmisión de los patógenos resistentes presentes en la piel o en las excreciones de los animales a través de heridas, mucosas o por inhalación de aerosoles (Klous et al. 2016, Zhang et al. 2024). Una vez que el trabajador es colonizado por las bacterias resistentes, éstas pueden transmitirse a otras personas de su entorno ampliando el alcance del problema (Mollema et al. 2010).

Finalmente, las posibles bacterias resistentes que hayan infectado a los animales en una explotación ganadera pueden llegar al medio ambiente a través de varias vías, principalmente mediante el empleo de fertilizantes orgánicos hechos a partir de excrementos animales o a través de los sistemas de aguas residuales que recogen los desechos de las granjas. De esta manera, las bacterias pueden alcanzar suelos agrícolas donde se emplean estos fertilizantes o dispersarse en masas de agua. Una vez en el medio ambiente, las bacterias resistentes pueden diseminarse geográficamente, expandiendo sus genes de resistencia a los antibióticos a diferentes regiones (Rees et al. 2021). Además, en el entorno las bacterias resistentes no permanecen aisladas si no que comparten el espacio con otras muchas especies bacterianas, lo que facilita el intercambio de genes de resistencia, incrementa la diversidad y favorece la formación de comunidades con una elevada capacidad de adaptación y resistencia a los antibióticos (Serwecińska 2020). El riesgo para la salud humana aparece cuando estas bacterias resistentes infectan a las personas ya sea a través del contacto directo con el suelo o el agua contaminada o a través de la cadena alimentaria a través del consumo de vegetales frescos o alimentos cárnicos y pesqueros infectados entre otros (Gerba 2015). La figura 7 ilustra las principales vías de interconexión en el medio ambiente.

Figura 7: Vías de interconexión en el medio ambiente



Modificado de Chacón et al. Fuente:(Chacón et al. 2022) .

2.2.1.1 Orígenes y principales mecanismos de la resistencia antimicrobiana

El desarrollo de resistencias bacterianas no es un fenómeno novedoso sino un reflejo de la elevada adaptabilidad evolutiva que tienen los microorganismos. Desde mucho antes del empleo de los antibióticos de forma terapéutica, los microorganismos ya habían implementado mecanismos de defensa como medio evolutivo para sobrevivir ante entornos hostiles (Smith et al. 2023).

En la naturaleza, estos microorganismos conviven en complejos ecosistemas donde compiten entre sí y con otros organismos no microbianos por recursos esenciales para su supervivencia como son los nutrientes, la energía y el propio espacio. Esta competencia ha impulsado a ciertas especies a desarrollar estrategias de antibiosis, de producción de sustancias que eliminen a sus competidores. Como respuesta, otros organismos han desarrollado mecanismos que les permiten neutralizar o evadir estos compuestos para sobrevivir (Larsson and Flach 2022).

Un ejemplo de ello es la competición que existe entre las distintas bacterias presentes en el suelo y las plantas y hongos que crecen en él por nutrientes como el fósforo y el nitrógeno (Huisman and Hulot 2005). Para conseguir inhibir el crecimiento o directamente eliminar a sus competidores, ciertos organismos (como el hongo *Penicillium*) poseen mecanismos de producción de compuestos (como la penicilina) que inhibe el crecimiento de las bacterias. A su vez, las bacterias afectadas sufren mutaciones que de forma aleatoria pueden dar lugar a genes que les permiten sobrevivir (produciendo una enzima beta-lactamasa que hidroliza la penicilina desactivándola). De este modo la comunidad bacteriana que posea la mutación puede persistir en el entorno a pesar de la presencia del antibiótico (Kong, Schneper and Mathee 2010).

Estos mecanismos de resistencia pueden incluir la producción de sustancias que eliminen el antibiótico, la alteración de estructuras propias de los microorganismos, la expulsión del antibiótico del interior de la célula o cambios en las rutas metabólicas entre otros (Wanda 2018). En la tabla 3 se encuentran los principales mecanismos de resistencia frente a los antibióticos:

Tabla 3: Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos

Mecanismo de resistencia	Explicación	Ejemplo
Destrucción o alteración del antibiótico	Los microorganismos producen enzimas que destruyen o inactivan el principio activo del antibiótico.	*Escherichia coli* produce beta-lactamasas de amplio espectro que inactivan múltiples antibióticos beta-lactámicos (Husna et al. 2023)
Alteración del sitio de acción del antibiótico	Los microorganismos pueden modificar las estructuras a las que se unen los antibiótico.	*Streptococcus pneumoniae*, altera sus proteínas de unión a penicilinas, volviéndose resistente a este tipo de medicamentos (Chambers 1999).
Reducción de la acumulación intracelular del antibiótico	Los microorganismos pueden alterar las proteínas de permeabilidad o desarrollar bombas de eflujo que expulsan el antibiótico antes de que ejerza su efecto.	*Pseudomonas aeruginosa* utiliza bombas de eflujo para resistir a múltiples fármacos, como macrólidos, tetraciclinas y beta-lactámicos (Lorusso et al. 2022)
Evasión metabólica	Los microorganismos pueden reemplazar las rutas metabólicas que son objetivo del antibiótico.	*Enterococcus faecalis* puede desarrollar resistencia a los inhibidores de síntesis de folato como el trimetoprim-sulfametoxazol al adquirir el folato por vías metabólicas alternativas (Miller, Munita and Arias 2014).

Elaboración propia. Varias fuentes.

2.2.1.2 Consecuencias de la resistencia a los antibióticos

La propagación de bacterias resistentes tiene implicaciones severas tanto para la salud pública como para la economía global. Las infecciones causadas por bacterias resistentes suelen requerir tratamientos más complejos, empleando antibióticos de segunda o tercera generación, que son derivados estructurales de compuestos previos modificados para ampliar su espectro antimicrobiano o mejorar su estabilidad frente a mecanismos de resistencia bacteriana. Estos antibióticos resultan más costosos y suelen presentar mayores efectos secundarios para los pacientes (Shi et al. 2023). Además, el

aumento de hospitalizaciones y la necesidad de mayores atenciones asociada a infecciones resistentes elevan la carga de hospitales y clínicas, ocupando recursos que podrían ser empleados en tratar otras patologías y contribuyendo al colapso de los sistemas sanitarios en regiones que presenten limitaciones (Mauldin Patrick et al. 2010, Nelson et al. 2021, Poudel et al. 2023). Se estima que los costos asociados a la aparición y propagación de resistencias antimicrobianas podrían alcanzar el billón de dólares para el año 2050 (Burki 2018).

En el ámbito laboral, las pérdidas en la producción económica atribuibles a esta problemática podrían situarse entre 20 y 35 billones (10^{12}) de dólares en ese mismo periodo, lo que la convierte en una amenaza significativa para el crecimiento económico global (O'Neill 2014). Las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes suelen prolongar los periodos de ausencia laboral, disminuyendo así la productividad y eficiencia de las empresas. Además, las secuelas derivadas de estas infecciones pueden generar incapacidades permanentes que impidan la reincorporación de los afectados a su puesto de trabajo, e incluso, en los casos más graves, provocar la muerte prematura del paciente (Dadgostar 2019).

En los últimos años las resistencias bacterianas han evolucionado a un ritmo alarmante amenazando la eficacia de muchos de los tratamientos actuales. Las infecciones por bacterias multirresistentes ya se han convertido en la tercera causa de muerte a nivel mundial con 4.95 millones de muertes atribuibles en el año 2019 solo por detrás de las cardiopatías isquémicas y los accidentes cerebrovasculares (Murray et al. 2022). La WHO ha advertido que, si no se toman medidas efectivas la situación podría empeorar (Salam et al. 2023b). En 2021, la resistencia antimicrobiana estuvo asociada a 4.71 millones de muertes, de las cuales 1.14 millones fueron directamente atribuibles. Para 2050, se proyecta que estas cifras podrían aumentar hasta 8.22 millones de muertes asociadas y 1.91 millones atribuibles a nivel global (Naghavi et al. 2024). Como es habitual, los países en vías de desarrollo donde los sistemas de salud ya se enfrentar a importantes limitaciones, serían los más afectados, incrementando así la brecha entre los países ricos y pobres (Pulingam et al. 2022).

Frente a este escenario, es crucial promover el uso racional de estos compuestos al mismo tiempo que se fomenta la investigación en el desarrollo de nuevos antibióticos y en la búsqueda de alternativas a los mismos para que las generaciones futuras puedan seguir beneficiándose de ellos (Ferraz 2024).

2.2.2 Presencia de antibióticos en el medio ambiente

El uso masivo de antibióticos en medicina, veterinaria y agricultura no solo favorece la aparición de bacterias resistentes que amenazan la salud humana y animal, sino que también provoca su diseminación al medio ambiente junto con residuos de los propios fármacos, convirtiendo su impacto en un problema global.

Además, estos compuestos diseñados para combatir infecciones en humanos, animales y cultivos están siendo cada vez más considerados como contaminantes ambientales por sí mismos. Su persistencia y su actividad biológica representan una seria amenaza para el medio ambiente, ya que su acción no se limita a eliminar a los microorganismos patógenos que busca combatir; pudiendo dañar a organismos no-diana afectando negativamente a la biodiversidad y alterando el equilibrio de los ecosistemas (Kraemer, Ramachandran and Perron 2019).

2.2.2.1 Fuentes de antibióticos en el medio ambiente

Los antibióticos pueden ingresar en el medio ambiente a través de distintas rutas:

La excreción de antibióticos por humanos y animales bajo tratamiento representa una de las principales vías de entrada de estos compuestos al medio ambiente. La mayor parte de los antibióticos administrados no se metabolizan completamente en el organismo, lo que se traduce en que una fracción significativa de los mismos se elimina manteniendo sus propiedades antimicrobianas (Kulik, Lenart-Boroń and Wyrzykowska 2023). En las zonas urbanas de países desarrollados, los desechos atraviesan el sistema de alcantarillado para llegar a las plantas de tratamiento de aguas residuales. Pese a que estos sistemas son eficaces en la retención de materia orgánica, muchas de ellas no están diseñadas específicamente para eliminar los residuos farmacéuticos que se encuentren disueltos en el agua y acaban en los entornos naturales (Alam et al. 2021, de Ilurdoz, Sadhwani and Reboso 2022). Estas aguas están especialmente contaminadas en zonas donde llegan las aguas residuales hospitalarias, con concentraciones de fármacos, como se expondrá en detalle más adelante, mayores a las encontradas en aguas residuales domésticas comunes (Paulus et al. 2019). De igual modo, se ha documentado que entre un 70 y un 90% de los antibióticos administrados a los animales en las granjas se excretan de forma inalterada o mediante metabolitos activos y acaban formando parte del estiércol que posteriormente se emplea como fertilizante, facilitando

la liberación de estos compuestos farmacéuticos al entorno (Massé, Saady and Gilbert 2014). Por ejemplo, hasta el 90% del ingrediente activo de las sulfonamidas o hasta el 65% de la clortetraciclina se elimina por las heces y orina del animal (Quaik et al. 2020).

Otra vía de entrada de antibióticos al medio ambiente es la mala gestión de los vertidos industriales de la producción farmacéutica. Las aguas residuales generadas en los procesos de síntesis pueden contener moléculas activas o subproductos con actividad antimicrobiana que, si no son tratados adecuadamente, alcanzan el medio ambiente. Mientras que la legislación en países desarrollados exige sistemas de control estrictos, en naciones en vías de desarrollo como India o China la falta de supervisión ha dado lugar a zonas altamente contaminadas, con concentraciones en aguas residuales superiores a los niveles considerados seguros. (Nijsingh, Munthe and Larsson 2019).

La presencia de antibióticos en el medio ambiente no es un fenómeno limitado al lugar de su emisión. Estos compuestos pueden volatilizarse, unirse a partículas en suspensión o incorporarse a microgotas de agua en la atmósfera, lo que facilita su transporte a grandes distancias por acción del viento. Finalmente, se depositan en suelos y cuerpos de agua a través de la lluvia o la sedimentación seca, permitiendo que residuos procedentes de áreas urbanas, agrícolas o industriales lleguen incluso a regiones remotas (Kormos et al. 2022, Gomes 2024). Por ello, la problemática de la contaminación ambiental por los antibióticos debe ser tratada mediante una cooperación internacional para conseguir ser efectiva.

2.2.2.2 Concentraciones de antibióticos detectadas en el medio ambiente

En los últimos años se han realizado diversos estudios que han detectado la presencia de antibióticos en gran variedad de ecosistemas acuáticos:

África también presenta casos relevantes. En Túnez, las aguas marinas cercanas a áreas de acuacultura mostraron concentraciones de cloranfenicol (CHL) de hasta 15.6 µg/L, mientras que el florfenicol (FF) alcanzó 18.4 µg/L (Tahrani et al. 2016). Por otro lado, en aguas superficiales de Nairobi se ha detectado sulfadiazina (SDZ) a concentraciones que llegaban a 0.84 µg/L y en efluentes del *"Kenyatta National Hospital"* a concentraciones de un máximo de 3.44 µg/L (Ngigi, Magu and Muendo 2019).

En América del Norte, estudios realizados en arroyos de los Estados Unidos detectaron concentraciones de clortetraciclina (CTC) que alcanzaron un máximo de 0.69 µg/L (Kolpin et al. 2002). Otro estudio en que se analizaron las aguas residuales urbanas de Wisconsin se detectaron 21 antibióticos entre los que destacaron la oxitetraciclina (OTC) que registró valores de hasta 50.6 µg/L, y la tetraciclina (TC) de 51.2 µg/L (Karthikeyan and Meyer 2006).

En América del Sur, la situación es igualmente preocupante, aunque la literatura sobre el tema es más limitada. En Brasil, se ha documentado la presencia de amoxicilina (AMO) en concentraciones de hasta 4.63 µg/L en los ríos Belém y Barigui (Böger et al. 2021).

En Asia, la contaminación por antibióticos en cuerpos de agua es particularmente alta, reflejando el papel de esta región como el mayor consumidor mundial de estos compuestos (Browne et al. 2021). En China, OTC ha demostrado ser el antibiótico más frecuentemente detectado en ambientes acuáticos (Guo et al. 2022), alcanzando concentraciones de 361.1 µg/L en cuencas fluviales del río Wangyang al norte del país; y seguida de CTC y TC que alcanzaron los 68.9 y 25.5 µg/L respectivamente (Jiang et al. 2014). Además, en las zonas de acuacultura cercanas al lago Tai se han detectado hasta 15 antibióticos distintos entre los que destacan el FF a concentraciones que alcanzan 2.7 µg/L (Song et al. 2016). En este mismo país, también se encontraron concentraciones mayores de 1 µg/L de SDZ y cercanas a 1 µg/L de eritromicina (ERY) en el río Chaobai (Su et al. 2020). Otros ríos al norte del país chino como el río Songhua también han mostrado concentraciones de antibióticos que llegan a los 0.12 µg/L del FF (Zhang et al. 2020a). En India, se encontraron hasta 3.1 µg/L de AMO y 2.2 µg/L de ERY en el río Yamuna (Akhter et al. 2023). En Corea del Sur también se ha estudiado la presencia de varios antibióticos en zonas costeras con industria de acuacultura cuantificando hasta 1.1 µg/L de AMO, 1.6 µg/L de FF y 9.9 µg/L de OTC (Choi et al. 2020).

En Europa, las concentraciones de antibióticos son más bajas en general, pero destacan en aguas residuales y en ríos adyacentes a las plantas depuradoras (Ng et al. 2023). En Bruselas, se encontraron hasta 116 µg/L de AMO y 1.96 µg/L de TC en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Lorenzo et al. 2018). Además, la gentamicina (GTM) ha sido hallada en aguas residuales de un hospital en Alemania con concentraciones que oscilan entre 4 y 7.6 µg/L (Löffler and Ternes 2003).

La Tabla 4 presenta las concentraciones detectadas en diversos ecosistemas acuáticos a nivel mundial:

Tabla 4: Concentraciones de antibióticos detectadas en ecosistemas acuáticos

Región	País	Antibiótico	Concentración (µg/L)	Zona de muestra	Fuente
África	Túnez	Cloranfenicol	Máximo=15.6	Agua marina	(Tahrani et al. 2016)
		Florfenicol	Máximo=18.4		
	Kenia	Sulfadiazina	0.84/3.44	Agua superficial/efluente hospital	(Ngigi et al. 2019)
América del Norte	Estados Unidos	Clortetraciclina	Máximo=0.69	Agua superficial	(Kolpin et al. 2002)
	Estados Unidos	Tetraciclina	Máximo=51.2	Aguas residuales urbanas	(Karthikeyan and Meyer 2006)
		Oxitetraciclina	Máximo=50.6		
América del Sur	Brasil	Amoxicilina	Máximo=4.63	Agua superficial	(Böger et al. 2021)
Asia	China	Oxitetraciclina	Máximo=361.1	Agua superficial	(Jiang et al. 2014)
		Clortetraciclina	Máximo=68.9		
		Tetraciclina	Máximo=25.5		
	China	Florfenicol	Máximo=2.7	Zona de acuacultura	(Song et al. 2016)
	China	Sulfadiazina	Mayor de 1	Agua superficial	(Su et al. 2020)
		Eritromicina	Cercano a 1		
	China	Florfenicol	Máximo=0.12	Agua superficial	(Zhang et al. 2020a)
	India	Amoxicilina	Máximo=3.1	Agua superficial	(Akhter et al. 2023)
		Eritromicina	Máximo=2.2		
	Corea del Sur	Amoxicilina	Máximo=1.1	Zona de acuacultura	(Choi et al. 2020)
		Florfenicol	Máximo=1.6		
		Oxitetraciclina	Máximo=9.9		
Europa	Bélgica	Florfenicol	Máximo=116.4	Planta tratamiento agua residual	(Lorenzo et al. 2018)
		Tetraciclina	Máximo=1.96		
	Alemania	Gentamicina	0.4-7.6	Agua residual hospital	(Löffler and Ternes 2003)

Elaboración propia. Varias fuentes.

La presencia de antibióticos en suelos tanto agrícolas como medioambientales también ha sido estudiada previamente:

En África, la irrigación con estiércol procedente de granjas en Kenia también ha contribuido a la acumulación de antibióticos en suelos agrícolas. En este sentido, se han documentado concentraciones medias de 251.8 µg/Kg de SDZ, 41.3 µg/Kg de OTC, 113.3 µg/Kg de TC y 5.8 µg/Kg de penicilina G (PENG) (Gudda et al. 2024).

En América del Norte, se han detectado aminoglucósidos a bajas concentraciones en suelos tratados con estiércol en Estados Unidos. Se ha encontrado la presencia de estreptomicina (STM) en suelos franco-arenosos a una concentración que ha llegado a 0.06 µg/Kg después de la aplicación de estiércol y de macrólidos como la ERY a concentración máxima de 7.2 µg/kg (Cycoń, Mrozik and Piotrowska-Seget 2019).

En América del Sur, se han encontrado residuos de antibióticos en suelos tratados con estiércol en Brasil, registrándose concentraciones de OTC de hasta 9.8 µg/kg y de ERY hasta 3.0 µg/kg (Bastos et al. 2020).

En Asia, los niveles de contaminación del suelo por antibióticos son, al igual que ocurría en el caso de los entornos acuáticos, particularmente elevados. En los sedimentos del río Pearl en China, se han detectado concentraciones de SDZ de hasta 83.9 µg/Kg, OTC 196 µg/Kg, TC 72.6 µg/Kg y ERY 385 µg/Kg (Yang et al. 2010). Por otro lado en suelos agrícola al sudeste de China se ha documentado la presencia de TC con concentraciones de hasta 22.3 µg/Kg (Pan, Wong and Chu 2014). Además, en sedimentos de varios ríos al norte del país se han registrado concentraciones de CTC de hasta 10 µg/Kg (Zhou et al. 2011) y en sedimentos cercanos al lago Baiyangdian también al norte del país se ha encontrado SDZ a concentraciones de hasta 2.07 µg/Kg y ERY de hasta 3.04 µg/Kg (Li et al. 2012). Por su parte, en Corea del Sur se ha cuantificado TC en suelos cercanos y sedimentos del río Naerincheon con concentraciones máximas de 177.64 µg/kg y 32.50 µg/kg, respectivamente. Asimismo, se han hallado CTC y OTC a concentraciones de 0.85 µg/kg y 0.71 µg/kg respectivamente en esos mismos suelos y 16.30 µg/kg y 1.43 µg/kg en los sedimentos del río. (Awad et al. 2014).

En Europa, se han cuantificado varias tetraciclinas en suelos agrícolas en Polonia, en concreto OTC a concentraciones máximas de 13.7 µg/kg y TC de 15.3 µg/kg (Łukaszewicz et al. 2018)

Estos hallazgos evidencian que estos compuestos pueden acumularse en el suelo debido al uso de estiércol y otros residuos agropecuarios. La tabla 5 presenta las concentraciones de antibióticos detectadas en diversos ecosistemas terrestres a nivel mundial:

Tabla 5: Concentraciones de antibióticos detectadas en ecosistemas terrestres

Región	País	Antibiótico	Concentración (µg/L)	Zona de muestra	Fuente
África	Kenia	Sulfadiazina	Media=251.8	Suelo agrícola	(Gudda et al. 2024)
		Oxitetraciclina	Media= 113.3		
		Penicilina G	Media=5.8		
América del Norte	Estados Unidos	Estreptomicina	Máximo=0.06	Suelo agrícola	(Cycoń et al. 2019)
		Eritromicina	Máximo=7.2		
América del Sur	Brasil	Oxitetraciclina	Máximo=9.8	Suelo agrícola	(Bastos et al. 2020)
		Eritromicina	Máximo=3.0		
Asia	China	Sulfadiazina	Máximo=83.9	Sedimentos de río	(Yang et al. 2010)
		Oxitetraciclina	Máximo=196		
		Tetraciclina	Máximo=72.6		
		Eritromicina	Máximo=385		
	China	Tetraciclina	Máximo=22.3	Suelo agrícola	(Pan et al. 2014)
	China	Clortetraciclina	Máximo=10	Sedimentos de río	(Zhou et al. 2011)
	China	Sulfadiazina	Máximo=2.07	Sedimentos cercanos a lago	(Li et al. 2012)
		Eritromicina	Máximo=3.04		
	Corea del Sur	Tetraciclina	Máximo= 177.64/32.50	Suelos próximos/ sedimentos de río	(Awad et al. 2014)
		Clortetraciclina	Máximo= 0.85/16.30		
		Oxitetraciclina	Máximo=0.71/ 1.43		
Europa	Polonia	Oxitetraciclina	Máximo=13.7	Suelo agrícola	(Łukaszewicz et al. 2018)
		Tetraciclina	Máximo=15.3		

Elaboración propia. Varias fuentes.

Es relevante que una vez presentes en el agua o el suelo del medio ambiente, los antibióticos pueden ser absorbidos por distintos cultivos y de este modo incorporarse a las redes tróficas (Bastos et al. 2020, Kim et al. 2012). En este sentido, se ha detectado CTC en concentraciones de 0.139 mg/kg en puerro, apio, col y rábano (Wang and Han 2008), así como de 0.017 mg/kg en cebolla (Kumar et al. 2005). Otro antibiótico del mismo grupo, la OTC, se ha hallado en un rango de 0.041 a 0.174 mg/kg en más de nueve cultivos, incluidas lechuga, zanahoria y patata (Yao et al. 2010). Por su parte, el FF ha sido detectado en lechuga y zanahoria, con valores entre 15 y 38 µg/kg (Boxall et al. 2006).

2.2.2.3 Persistencia de los antibióticos

Una vez liberados al medio ambiente, estos antibióticos pueden presentar actividad farmacológica durante largos periodos de tiempo que pueden llegar a durar varias semanas (Samreen et al. 2021). La velocidad de degradación de los mismos depende tanto de las propiedades intrínsecas del compuesto como de las condiciones del entorno en el que se encuentre.

A nivel del antibiótico, su estructura influye en su interacción con el medio y por tanto en su velocidad de degradación. Por ejemplo, las tetraciclinas y sulfonamidas tienden a adsorberse con las partículas del suelo formando complejos con los iones metálicos presentes, lo que prolonga su presencia en el ambiente (Conde-Cid et al. 2020). Otros compuestos como los macrólidos cargados positivamente interactúan con los grupos con carga negativa de la materia orgánica disuelta alterando su bioacumulación (Liu et al. 2019).

Las condiciones ambientales también influyen en la velocidad de degradación de los antibióticos. La presencia de luz solar en zonas superficiales ayuda a reducir la concentración de ciertos compuestos como las fluorquinolonas, a través de mecanismos de fotodegradación gracias a la luz ultravioleta que fragmenta las estructuras moleculares (Sturini et al. 2012). De igual modo, el pH del entorno también es un factor influyente en la velocidad de degradación; Los β-lactámicos experimentan diferentes rutas de degradación en condiciones ácidas y básicas, exhibiendo típicamente un perfil en forma de "U" en la velocidad de degradación en función del pH. Su estabilidad máxima se observa en un rango de pH de 4 a 5 para los β-lactámicos α-amino, como la amoxicilina y la ampicilina, y entre pH 6 y 7 para aquellos que carecen de un grupo

amino en la cadena lateral como la penicilina G (Brouwers et al. 2020, Hou and Poole 1971).

Por último, existen organismos capaces de utilizar ciertos antibióticos como fuente de carbono o nitrógeno lo que contribuye a su eliminación a través de procesos de biodegradación del entorno. Este proceso se encuentra documentado para bacterias del género *Pseudomonas* entre otros. Sin embargo, esta biodegradación depende de la propia capacidad de resistencia de los organismos involucrados y puede inhibirse en presencia de altas concentraciones de los antibióticos (Qu et al. 2022).

2.2.3 Consecuencias de la presencia de antibióticos en el medio ambiente

La presencia de antibióticos en el medio ambiente puede representar un desafío significativo para la sostenibilidad de los ecosistemas. Estos compuestos generan una serie de impactos negativos que derivan de su afectación tanto a las comunidades de bacterias como a organismos no-diana presentes en el medio ambiente.

Incluso a niveles bajos, puede producirse una eliminación selectiva que reduce la diversidad bacteriana y puede derivar en un desequilibrio que afecte a procesos ecológicos fundamentales (Ding and He 2010). Una de las funciones más importantes de las comunidades microbianas para los ecosistemas es el reciclaje de nutrientes. Las bacterias del suelo, por ejemplo, desempeñan un papel esencial en el ciclo del nitrógeno, al convertir formas de nitrógeno no disponibles para las plantas, como el amonio y los nitratos, en compuestos útiles para su absorción. Si los antibióticos alteran estas comunidades, este proceso puede verse interrumpido, lo que lleva a una acumulación de nutrientes no procesados, dejando a las plantas sin acceso a estos recursos esenciales (Zhai et al. 2023). Del mismo modo, el ciclo del carbono, otra función crucial para la sostenibilidad del ecosistema donde intervienen las comunidades microbianas, también se ve afectado. La disminución de bacterias que descomponen la materia orgánica en el suelo puede llevar a una acumulación de materia orgánica no degradada y una alteración en el balance energético del ecosistema (Fang et al. 2025).

Estas alteraciones impactan directamente en la fertilidad del suelo, afectando a su capacidad para la producción agrícola al disminuirse la presencia de nutrientes

esenciales para las plantas. Esto no solo produce un menor rendimiento de los cultivos si no que, además, los hace más susceptibles a sufrir más enfermedades (Fang et al. 2025).

Además, la presencia de antibiótico en el entorno natural puede llevar a su biomagnificación a través de las cadenas tróficas. Esto genera una acumulación progresiva en las distintas especies que puede generar efectos adversos tanto a nivel de crecimiento, reproducción y estado de salud de los organismos (Hu et al. 2023). Así mismo, la persistencia de antibiótico en los organismos puede prolongar su impacto negativo en el medioambiente, disminuyendo la capacidad del ecosistema de regenerarse al someter a las bacterias a una presión constante a bajas dosis de antibiótico (Xiao et al. 2023).

Estas bacterias del entorno no patógenas pueden actuar como reservorios genéticos, albergando genes que las hace inmunes a los antibióticos. Aunque por sí mismas no representen un riesgo para la salud, su capacidad para transferir estos genes a otras bacterias sí representa un problema significativo (Westphal-Settele et al. 2018).

Finalmente, estas bacterias patógenas que han adquirido resistencia pueden reintroducirse en la cadena alimentaria y afectar a los seres humanos y los animales de granja. A medida que estas bacterias resistentes se multiplican y se propagan, el problema se agrava, ya que infecciones que antes podían tratarse con antibióticos comunes se vuelven cada vez más difíciles de erradicar (Wright 2010).

Además de los problemas asociados a la dispersión de resistencias, existen numerosos estudios que evidencian que la presencia de antibióticos en el medioambiente supone un riesgo importante de toxicidad para los organismos que habitan en él.

En el caso de los organismos indicadores, se han realizado estudios en organismos acuáticos como *A. fischeri* y *D. magna* donde antibióticos como el CHL ha demostrado una elevada toxicidad (Choi et al. 2008) o PENG y TC también han demostrado toxicidad en esos mismos indicadores (Havelkova et al. 2016). En el caso de organismos terrestres, se ha demostrado la toxicidad de antibióticos como la OTC o el ciprofloxacino en el crecimiento de varias especies vegetales como *Lolium perenne* y *Raphanus sativus* (Cláudio Ernesto Taveira, Jordi and Esther 2018). Asimismo, PENG y

TC han demostrado toxicidad en organismos de suelo como *Eisenia fetida* (Havelkova et al. 2016).

En el caso de comunidades microbianas se ha demostrado que el empleo de antibióticos afecta tanto al crecimiento de las bacterias (Rodríguez-González et al. 2023) como a su metabolismo (Belenky et al. 2015) y lo mismo ocurre con productos naturales con actividad antimicrobiana (Pino-Otín et al. 2023b, Pedrinho et al. 2024, Sacristán-Soriano, Banaigs and Becerro 2012, Gan et al. 2024)

Existen finalmente diversas investigaciones que han evaluado la toxicidad que resulta de la combinación de varios antibióticos, demostrando que las interacciones entre los compuestos pueden potenciar los efectos tóxicos en el medio ambiente. Por ejemplo se han analizado los efectos que producen las combinaciones binarias de AMO, ERY, TC, levofloxacino y norfloxacino sobre bioindicadores acuáticos como la cianobacteria *Anabaena* y el alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* observando que en la mayor parte de los casos se potencia la actividad tóxica de los compuestos individuales (González-Pleiter et al. 2013). Del mismo modo, se ha investigado la toxicidad derivada de la combinación de antimicrobianos con distintos productos químicos, por ejemplo, se ha documentado que el imidazol y ciertos pesticidas pueden presentar una toxicidad potenciada cuando se emplean conjuntamente sobre bioindicadores como *A. fischeri*, *D. magna*, *P. subcapitata* o *L. minor* (Cedergreen, Kamper and Streibig 2006).

En el caso de comunidades bacterianas se ha demostrado que la combinación de varios antibióticos afecta al crecimiento y la estructura de las comunidades bacterianas acuáticas (Proia et al. 2013).

2.3 Soluciones ante las resistencias y la ecotoxicidad de los antibióticos

Abordar los problemas relacionados con la aparición resistencias bacterianas y la ecotoxicidad de los antibióticos requiere de un enfoque multidimensional en el que se integren estrategias científicas, regulatorias y sociales. A continuación, se describen algunas de las principales soluciones planteadas:

2.3.1 Medidas psicosociales

Los problemas relacionados con el empleo de antibióticos han movilizado a la comunidad internacional, en busca de implementar estrategias globales y coordinadas. La WHO lidera este movimiento acompañada de otras organizaciones como la FAO o la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH, por sus siglas en inglés), a través de un enfoque multidisciplinar que tiene como objetivo el *"One health"*, es decir, la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental (Orand 2024). Las estrategias se centran en reducir el uso de antibióticos a través de diferentes enfoques:

1. Uso racional de antibióticos: Los esfuerzos se centran en reducir el empleo de los antibióticos a través de políticas de uso responsable. Entre ellas se promueve a los países a establecer guías de uso clínico donde la prescripción de estos compuestos se limite únicamente a aquellos casos en los que sean necesarios basándose en la evidencia científica (Ragnini, Schvinn Júnior and Zanotto 2022). También se promueve el establecimiento de políticas que prohíban el empleo de antibióticos como promotores del crecimiento en la ganadería, empleo que como se ha expuesto anteriormente es una de las principales causas de aparición de resistencias (Casewell et al. 2003).

2. Promoción de la prevención: Otro aspecto sobre el que se está trabajando desde las organizaciones internacionales es la de mejorar la higiene y el saneamiento de los países en vías de desarrollo. Gracias a estas medidas se pretende prever la aparición de infecciones para reducir la necesidad de emplear antibióticos y por tanto disminuir la aparición de resistencias

asociados a los mismos (Essack 2021). Las políticas de fomento de la vacunación son aspecto clave en esta prevención, se centran en lograr una amplia cobertura poblacional mejorando su acceso en los países en desarrollo y haciendo frente a los movimientos antivacunas en los países desarrollados (Hasso-Agopsowicz et al. 2024).

3. Mejora de la gestión de los residuos: Para reducir la presencia de antibióticos en el medio ambiente se está trabajando en implementar sistemas avanzados de tratamiento de residuos, incorporando filtros que eliminen estos compuestos en las plantas de tratamiento y controlando el uso de fertilizantes procedentes de la ganadería (Goulas et al. 2018).

4. Educación a la población: En más de 120 países se han desarrollado distintas campañas de concienciación alineadas con el Plan de Acción Global sobre Resistencias Antimicrobianas de la WHO. En ellas se busca aumentar el conocimiento sobre los riesgos del uso inapropiado de los antibióticos y la prevención de enfermedades. Van dirigidas tanto a los profesionales sanitarios como a la población general teniendo en cuenta las características propias del país que la desarrolla (Charani et al. 2023). La figura 8 muestra la portada del Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos de España en el año 2024.

Figura 8: Campaña PRAN 2024

Elaborado por Ministerio de Sanidad, Gobierno de España. Fuente: https://resistenciaantibioticos.es/es/lineas-de-accion/comunicacion/campanas/campana-pran-2024-antibioticos-protegernos-es-su-trabajo

2.3.2 Investigación de alternativas a los antibióticos

Uno de los ejes estratégicos del PRAN es el fomento de iniciativas de investigación (Lozano 2024). No obstante, la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos enfrentan numerosos desafíos que han obstaculizado el surgimiento de alternativas terapéuticas eficaces frente a la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos.

Para que una molécula sea considerada un candidato viable, debe cumplir con una serie de requisitos estrictos: eliminar eficazmente las bacterias causantes de la infección sin provocar efectos adversos en el paciente. Esto implica que el compuesto debe alcanzar el sitio de infección en concentraciones terapéuticas óptimas sin inducir toxicidad significativa en el organismo (Anderson et al. 2023).

A pesar de los avances en biotecnología y el desarrollo de estrategias modernas de cribado de alto rendimiento, como el *high-throughput screening* (HTS), los resultados en la búsqueda de nuevos antibióticos no han sido los esperados. Se estima que la eficiencia del HTS en la identificación de antibióticos efectivos es de cuatro a cinco veces menor en comparación con la obtenida para cualquier otra clase terapéutica (García-Rey 2010). Esta baja eficiencia se debe a múltiples factores, incluyendo la limitada diversidad estructural de las bibliotecas químicas actuales, la dificultad para penetrar la membrana de las bacterias gramnegativas y la creciente resistencia adquirida por los patógenos. Además, muchos compuestos que muestran una potente actividad antimicrobiana en estudios *in vitro* fracasan al ser evaluados en modelos animales o en ensayos clínicos debido a problemas de toxicidad, falta de eficacia *in vivo* o propiedades farmacocinéticas subóptimas (Årdal et al. 2020).

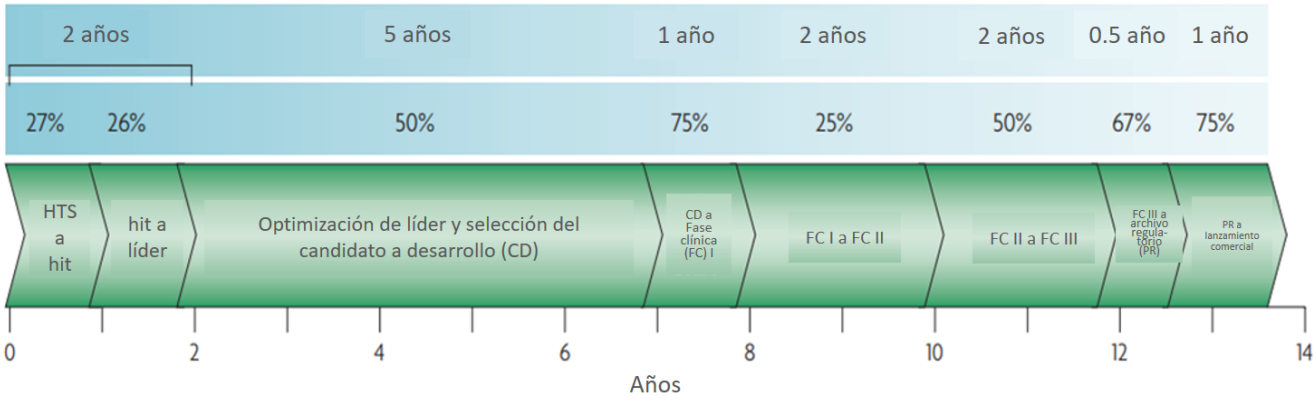
Como consecuencia, la tasa de fracaso durante las etapas preclínicas y clínicas es muy elevada. Se calcula la probabilidad de que un antibiótico logre avanzar desde la fase de descubrimiento inicial hasta su aprobación regulatoria es de entre un 1.5 % y un 3.5 %, con un tiempo promedio de desarrollo que oscila entre 10 y 15 años (Anderson et al. 2023).

El impacto de estas dificultades ha sido evidente en la historia reciente del desarrollo de antibióticos. Entre 1962 y 2000, no se introdujo al mercado ninguna nueva clase de antibióticos. Esta sequía científica fue finalmente interrumpida en el año 2000

con la aprobación del linezolid, un oxazolidinona que representó el primer avance significativo en la lucha contra las infecciones resistentes en décadas (Coates et al. 2002). No obstante, desde entonces, la introducción de nuevos antibióticos ha sido esporádica, y la mayoría de los fármacos recientes son modificaciones de estructuras ya conocidas en lugar de innovaciones (Theuretzbacher et al. 2020)

La figura 9 muestra la duración y la probabilidad de éxito de las distintas fases de la investigación de nuevos antibióticos.

Figura 9: Duración y probabilidad de éxito de las fases de investigación de nuevos antibióticos



Modificado de Payne et al. Fuente: (Payne et al. 2007)

Otro aspecto negativo del desarrollo de antibióticos es la falta de incentivos económicos para su desarrollo y comercialización. El principal factor que lo ocasiona es la naturaleza del tratamiento con antibióticos, que suele ser de corta duración (días o semanas), en contraste con los medicamentos destinados a enfermedades crónicas, como la diabetes o las patologías cardiovasculares, que los pacientes deben tomar de por vida. Además, los nuevos antibióticos suelen reservarse como última línea de defensa contra infecciones multirresistentes, restringiendo su uso clínico para retardar la aparición de resistencias. En consecuencia, los volúmenes de venta de estos fármacos son bajos, lo que reduce drásticamente el retorno de inversión para las compañías farmacéuticas.

Los datos económicos reflejan con claridad esta disparidad. Se ha estimado que el valor actual neto (*Net Present Value*, NPV) esperado para el desarrollo de un antibiótico es negativo, situándose en aproximadamente –50 millones de dólares. En contraste, el NPV de un fármaco para enfermedades neurológicas es de +720 millones

de dólares, y el de un medicamento para afecciones musculoesqueléticas supera los +1150 millones de dólares (Sharma and Towse 2011).

Es decir, en promedio, el desarrollo de un antibiótico no solo no recupera la inversión, sino que resulta en pérdidas, mientras que otras áreas terapéuticas ofrecen márgenes de ganancia significativamente más altos. Como resultado, muchas compañías farmacéuticas han optado por retirar o reducir sus programas de investigación en antibióticos, priorizando en su lugar inversiones en sectores más rentables (Anderson et al. 2023).

Un ejemplo reciente y emblemático es el de "*Achaogen*", una empresa biotecnológica estadounidense que desarrolló el antibiótico plazomicina (una aminoglucósido diseñado contra bacterias multirresistentes) con más de $500 millones de financiación pública y privada. Logró llevar plazomicina al mercado obteniendo aprobación de la FDA en 2018, pero con una indicación muy restringida (infecciones urinarias complicadas) y un uso clínico reservado solo a las infecciones más resistentes. Como resultado, las ventas fueron prácticamente nulas y la empresa no pudo recuperar la inversión, declarando la bancarrota en abril de 2019, apenas un año después de la aprobación (Wells, Nguyen and Harbarth 2024).

Ante estas dificultades, la comunidad científica ha dirigido su atención hacia el empleo de terapias alternativas para reducir la dependencia a los antibióticos tradicionales (Årdal et al. 2020). Entre estas nuevas vías de investigación se encuentran los productos naturales antimicrobianos, bacteriófagos, terapias basadas en CRISPR-Cas y la inmunoterapia:

2.3.2.1 Productos naturales antimicrobianos

Se considera producto natural a los compuestos químicos que son producidos por organismos vivos como plantas, animales, hongos, bacterias y otros microorganismos. Estos compuestos pueden poseer bioactividad desempeñando distintas funciones biológicas (Bontempo, De Masi and Rigano 2023). Frecuentemente actúan como mecanismo de defensa ante patógenos bacterianos presentes en el entorno, permitiéndoles prosperar en el medio ambiente (Arseneault and Filion 2017). Los distintos productos naturales que actúan como antimicrobianos presentan una amplia variedad de mecanismos de acción, reflejo de su diversidad de origen (Vaou et al. 2021,

Eshboev et al. 2024, Stan et al. 2021). La tabla 6 muestra distintos ejemplos de productos naturales con actividad antibiótica y su mecanismo de acción.

Tabla 6: Compuestos de origen natural con actividad antimicrobiana demostrada

Reino	Producto natural	Especie representativa	Mecanismo de acción	Referencia
Animalia	Propóleo	*Apes mellifera*	Alteración de la membrana celular bacteriana	(Almuhayawi 2020)
	Mucina	*Homo sapiens*	Alteración de la membrana celular bacteriana	(Radtke, Quayle and Herbst-Kralovetz 2012)
	Ageliferina	*Agelas conífera*	Inhibe la formación de biofilms bacterianos[a]	(Pech-Puch et al. 2020)
Plantae	Berberina	*Berberis vulgaris*	Inhibe la replicación del ADN bacteriano	(Imenshahidi and Hosseinzadeh 2016)
	Carvacrol	*Origanum vulgare*	Alteración de la membrana celular bacteriana	(Hao, Li and Shi 2021)
	Ácido gálico	*Phyllanthus amarus*	Alteración de la pared celular bacteriana	(Keyvani-Ghamsari, Rahimi and Khorsandi 2023)
Fungi	Penicilina	*Penicillium notatum*	Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana	(Doi and Chambers 2015)
	Cefalosporina	*Acremonium chrysogenum*	Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana	(Liu et al. 2022)
	Pleuromutilina	*Clitopilus passeckerianus*	Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas	(de Mattos-Shipley, Foster and Bailey 2017)
Monera	Gentamicina	*Micromonospora purpurea*	Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas	(Nielson, Hsu and Motaparthi 2021)
	Tetraciclina	*Streptomyces aureofaciens*	Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas	(Pogue et al. 2017)
	Cloranfenicol	*Streptomyces venezuelae*	Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas	(Izard 2001)
Protista	Climacostol	*Climacostomum virens*	Inhibe la replicación del ADN bacteriano	(Petrelli et al. 2012)
	Euplotina C	*Euplotes crassus*	Alteración de la membrana celular bacteriana	(Savoia et al. 2004)
	Alexandriolida	*Alexandrium tamarense*	Alteración de la membrana celular bacteriana	(Ma et al. 2011)

[a] Biofilms: comunidad microbiana estructurada, adherida a superficies y embebida en una matriz extracelular autogenerada.
Elaboración propia. Varias fuentes.

Los productos naturales, en especial los procedentes de origen fúngico y bacteriano, han sido la base principal para el desarrollo de antibiótico sintéticos empleados en medicina. Estos compuestos han proporcionado no solo modelos estructurales, sino también mecanismos de acción innovadores que han permitido a la industria farmacéutica generar nuevos fármacos que los imitasen (Atanasov et al. 2021).

Además de haber servido como punto de partida para el desarrollo de antibióticos, estos productos también pueden emplearse directamente como antimicrobianos. Poseen ciertas ventajas, entre ellas un mecanismo de acción inespecífico capaz de afectar a múltiples estructuras bacterianas, lo que reduce la probabilidad de que se produzcan resistencias bacterianas en comparación con aquellos que sí actúan sobre dianas específicas (Kaushik, Sharma and Kumar 2025). Además, la producción de estos compuestos en el organismo de origen ocurre en respuesta a una necesidad específica, como la defensa contra patógenos o la competencia por recursos (Sacristán-Soriano et al. 2012, Esquenazi et al. 2011). Esto implica que dichos compuestos presentan una estabilidad limitada, ya que su función biológica no requiere una permanencia prolongada en el entorno. Como resultado, una vez liberados en el medio ambiente, tienden a degradarse a mayor velocidad que los antibióticos sintéticos, lo que reduce su persistencia y minimiza su impacto ecológico a largo plazo (Fernanda et al. 2019).

La mayor parte de la literatura científica existente se centra en evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos naturales procedentes de orígenes vegetales. Estos compuestos son en su mayoría metabolitos secundarios, los cuales desempeñan funciones defensivas en las plantas contra microorganismos patógenos, herbívoros y estrés ambiental. Entre los principales metabolitos con propiedades antimicrobianas demostradas se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides y alcaloides. Los compuestos de cada uno de estos grupos presentan propiedades específicas que les hacen eficaces frente a distintas especies bacterianas (Adamczak, Ożarowski and Karpiński 2020). Por ejemplo, estudios recientes han documentado la actividad antimicrobiana de la vitexina contra *Pseudomonas aeruginosa* a partir de 260 µg/mL (Das et al. 2016). De manera similar, otros estudios también han demostrado la capacidad de productos naturales obtenidos de plantas como el caso de la apigenina o el ácido clorogénico a rangos de 2-128 µg/mL según la bacteria evaluada (Özçelik, Kartal and Orhan 2011). Asimismo, el ácido caféico

ha demostrado capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli* a dosis mayores a 250 µg/mL (Matejczyk et al. 2018).

Además, muchos de estos compuestos poseen propiedades adicionales, como actividades antioxidantes y antiinflamatorias, que contribuyen no solo a combatir la infección bacteriana, sino también a restaurar la homeostasis en el organismo tratado (Angiolella, Sacchetti and Efferth 2018).

Actualmente la comunidad científica ha comenzado a estudiar el potencial antimicrobiano de compuestos procedentes de otros orígenes como pueden ser bacterias, insectos o animales superiores (Ali, Siddiqui and Khan 2018). Por ejemplo, se ha demostrado capacidad antimicrobiana del quitosano a partir de 60 µg/mL en varias cepas bacterianas distintas (Kravanja et al. 2019)

Del mismo modo, varios estudios han explorado el comportamiento de productos naturales y antibiótico cuando se emplean en combinación. Este tipo de investigaciones persigue evaluar si los compuestos naturales pueden potenciar la actividad antimicrobiana de ciertos antibióticos mejorando su eficacia. Esta estrategia no solo complementa las acciones bactericidas de los compuestos, sino que dificulta que las bacterias desarrollen resistencias al actuar simultáneamente con mecanismos de acción distintos (Hemaiswarya, Kruthiventi and Doble 2008, Álvarez-Martínez, Barrajón-Catalán and Micol 2020). Este enfoque combinado tiene implicaciones tanto clínicas como ecológicas ya que disminuye la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos al mismo tiempo que permite reducir las dosis necesarias de los mismos. Esto no solo prolonga la eficacia de los tratamientos ya existentes, y reduce la aparición de resistencias, sino que minimiza la presencia de los antibióticos en los ecosistemas mitigando sus impactos medio ambientales (Polianciuc et al. 2020). Por ejemplo, el galato de epicatequina ha demostrado reducir la dosis de oxacillina para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Cushnie and Lamb 2011). De manera similar, el limoneno ha demostrado disminuir las dosis requeridas de antibióticos como la doxiciclina y la azitromicina para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* (Eladl et al. 2024).

Finalmente, aunque la literatura científica sobre este tema aún es limitada, se han encontrado algunos estudios que destacan la capacidad de ciertos productos naturales para inhibir los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias. Por

ejemplo, el sarotrín (flavonoide) que ha demostrado inhibir las bombas de expulsión activa NorA en *S. aureus* (Ng et al. 2021).

Sin embargo, la producción a gran escala de estos productos naturales presenta numerosos inconvenientes que limitan su empleabilidad. Por un lado, las concentraciones a las que se encuentran en la naturaleza son muy bajas; además, presentan una estructura molecular compleja que dificulta su síntesis y la misma inestabilidad que favorecía su baja persistencia también representa un reto a la hora de almacenarlos. Por otro lado, uno de los principales desafíos asociados al uso de productos naturales como alternativa a antibiótico radica en la elevada toxicidad que muchos de ellos presentan cuando se emplean de forma aislada, ya que las dosis necesarias para que sean eficaces suelen ser excesivamente altas (Beutler 2019). Esto no solo supone un riesgo para los pacientes, sino que también puede tener repercusiones negativas en el entorno. Por ejemplo, el ácido cinámico ha demostrado afectar al crecimiento de *Phaseolus vulgaris* (Jitareanu et al. 2019) o el ácido gálico que ha mostrado efectos perjudiciales en varias especies de algas (Techer et al. 2016). Sin embargo, estas consecuencias suelen ser menores a las producidas por los antibióticos por la baja persistencia que presentan (Fernanda et al. 2019).

En términos de disponibilidad y viabilidad económica, los productos naturales ofrecen también ventajas significativas. Los avances en biotecnología, como la edición genética y la metagenómica, está ayudando a descubrir nuevos productos naturales con potencial antimicrobiano y a mejorar la producción de aquellos que son inaccesibles a través de los métodos tradicionales solucionando estos problemas (Teijaro, Adhikari and Shen 2019). Su obtención, ya sea a través de la extracción directa de fuentes biológicas o de la fermentación biotecnológica, favorece su implementación en comparación con tecnologías emergentes, que requieren una personalización más compleja y costosa (Teijaro et al. 2019).

Es relevante nombrar dentro de los productos naturales a los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés). Se trata de moléculas peptídicas producidas por los organismos que forman parte de su respuesta inmune innata que hacen frente a bacterias, virus, hongos o incluso parásitos. Su mecanismo de acción se basa en alterar las membranas de los microorganismos provocando poros en la membrana por los que se produce una pérdida del contenido celular y desemboca en la lisis y muerte celular. Al actuar a través de una destrucción física de los microorganismos,

los AMPs poseen un amplio espectro de acción y unas bajas probabilidades de que los patógenos desarrollen mutaciones que les confieran resistencias frente a ellos. Además, son moduladores de la respuesta inmunitaria, favoreciendo la reducción de la inflamación y promoviendo la cicatrización de las heridas. No obstante, su empleabilidad es limitada ya que presentan una baja estabilidad en los organismos y su baja especificidad puede causar toxicidad celular en los pacientes bajo este tipo de tratamientos (Zhang et al. 2021a).

Otro grupo especialmente destacado dentro de los productos naturales de origen vegetal son los aceites esenciales, que son mezclas complejas de sustancias activas extraídas de las plantas (Wińska et al. 2019). Estos aceites suelen estar formados por compuestos bioactivos de bajo peso molecular como pueden ser monoterpenos o sesquiterpenos que les dotan de efectividad frente a una amplia gama de microorganismos (Silva et al. 2021). Debido a su origen natural, su composición puede variar según la especie de origen, las condiciones de cultivo o el método de recolección. Esto genera una amplia variabilidad que dificulta la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Por el contrario, el uso de compuestos puros asegura una composición constante haciendo posible la comparación de estudios entre diferentes ensayos y asegura fiabilidad y validez en las investigaciones científicas (Guedri Mkaddem et al. 2022).

2.3.2.2 Bacteriófagos

Se trata de virus que infectan únicamente a las bacterias, dando lugar a una herramienta prometedora frente a las infecciones. Al igual que el resto de los virus, están formados por material genético, que puede ser ADN o ARN, encapsulado en una cápside proteica. A diferencia de los antibióticos convencionales, que suelen actuar contra un amplio rango de bacterias, los bacteriófagos tienden a ser altamente específicos, atacando únicamente a determinadas cepas o especies bacterianas (Jia et al. 2023).

Su mecanismo de acción puede desarrollarse a través de dos ciclos distintos: En el ciclo lisogénico, el fago infecta a la bacteria mediante su unión a receptores específicos y toma el control del metabolismo bacteriano utilizando los recursos bacterianos para producir copias del material genético viral y las proteínas que forman las cápsides. Tras generar un número suficiente, se produce la síntesis de enzimas como la endolisisna que debilitan la pared celular bacteriana. Como consecuencia la bacteria se rompe, liberando

nuevos fagos al medio que pueden continuar infectando a más bacterias. Por otro lado, en el ciclo lisogénico, el material genético del fago se integra en el genoma bacteriano permaneciendo en estado latente y replicándose de forma pasiva en la división celular bacteriana. Este material genético puede permanecer inactivo durante varias generaciones hasta que, bajo ciertas condiciones, se activa desencadenando el ciclo lítico y la lisis bacteriana (Olawade et al. 2024).

Los bacteriófagos han demostrado ser una herramienta eficaz en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli*, todas ellas responsables de múltiples infecciones difíciles de tratar (Alqahtani 2023).

Como ventajas presentan una alta especificidad infectando únicamente a las bacterias diana sin afectar a las células del paciente ni a su microbiota evitando los efectos adversos de los antibióticos de amplio espectro. De igual forma, esta alta especificidad reduce las alteraciones en los ecosistemas. Además, pueden evolucionar junto a las bacterias, lo que los hace especialmente útiles para tratar infecciones causadas por cepas resistentes a los antibióticos (Jia et al. 2023).

Por otro lado, presentan inconvenientes derivados de su naturaleza vírica ya que pueden ser reconocidos y neutralizados por el sistema inmunológico del paciente antes de poder ejercer su efecto terapéutico (Marchi et al. 2023). Además, al ser organismos biológicos requieren de condiciones especiales de conservación para mantenerse su actividad (Łobocka, Głowacka and Golec 2018). Por otro lado, su alta especificidad obliga a la selección del fago necesario para cada infección; por ello el desarrollo de estas terapias es complejo y costoso económicamente (Hitchcock et al. 2023). Asimismo, las bacterias pueden desarrollar resistencias frente a estos fagos mediante diversos mecanismos de defensa, entre ellos el sistema CRISPR-Cas, que les permite reconocer y degradar el material genético viral, dificultando así la eficacia a largo plazo de las terapias basadas en fagos (Loureiro and da Silva 2019).

2.3.2.3 Terapias basadas en CRISPR-Cas

CRISPR son las siglas en inglés de "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*", se trata de secuencias repetitivas de ADN presentes en las

bacterias. Estas secuencias contienen material genético procedente de virus que las han atacado en el pasado, lo que les permite reconocer y defenderse de futuros ataques virales. Por su parte, Cas es un tipo de enzima que se asocia al sistema CRISPR con capacidad de cortar secuencias genéticas específicas (Li et al. 2023).

El mecanismo de acción de CRISPR-cas es similar a la respuesta inmune adaptativa de los organismos superiores. Durante la primera infección, las bacterias son capaces de capturar fragmentos de ADN de fagos que las atacan e integrarlos en su genoma dentro de las secuencias CRISPR. Si posteriormente se produce una reinfección por parte del mismo virus, la bacteria transcribe los genes contenidos en el sistema CRISPR formando ARN guía complementario. Este ARN se une a la enzima Cas formando un complejo que identifica y corta de manera específica el ADN viral con el que establece complementariedad. De esta forma se neutraliza la infección de forma precisa (Loureiro and da Silva 2019).

Los investigadores han logrado adaptar este sistema diseñando moléculas de ARN que dirijan a la enzima Cas hacia un gen concreto en cualquier organismo. Con ello han conseguido modificar secuencias genéticas para tratar enfermedades como el cáncer o la eliminación de bacterias patógenas al atacar a su genoma (Li et al. 2023).

Como alternativa a los antibióticos tradicionales, CRISPR-Cas presenta una mayor especificidad pudiendo atacar únicamente a un tipo las bacterias patógenas sin dañar a al resto de bacterias dentro de una comunidad como el microbioma (Sen and Mukhopadhyay 2024). Sin embargo, su uso entraña varios inconvenientes ya que, al tratarse de material genético externo, puede activar la respuesta inmune del organismo hospedador impidiendo su actuación (Charlesworth et al. 2019). Por otro lado, es posible que el ARN guía se una a secuencias similares a la diana afectando a otros procesos celulares (Modrzejewski et al. 2020). Además, las bacterias pueden evolucionar y desarrollar sistemas de defensa como mutaciones en el gen diana o sistemas de inactivación de la enzima que las hagan resistentes (Westra and Levin 2020).

Es por estas limitaciones que, pese a que se trata de una herramienta prometedora capaz de hacer frente a las bacterias resistentes a antibiótico, es necesario garantizar su seguridad y eficacia clínica antes de poder emplearlos.

2.3.2.4 Inmunoterapia

La inmunoterapia hace referencia a tratamientos diseñados para modular el sistema inmune y de esta forma hacer frente a infecciones, enfermedades autoinmunes o procesos oncológicos. Dentro de las infecciones bacterianas, la inmunoterapia se basa en empleo de anticuerpos o vacunas como alternativa a los antibióticos tradicionales (McCulloch, Wells and Souza-Fonseca-Guimaraes 2022).

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune que reconocen y neutralizan patógenos. Actúan de forma selectiva y son menos susceptibles de que las bacterias generen resistencia frente a ellos (Luo et al. 2025). Por otro lado, las vacunas son preparados diseñados para estimular la respuesta inmune y proteger al hospedador de futuras infecciones (Ebbers et al. 2021). Con su uso se reduce la incidencia de las infecciones y por tanto la necesidad de emplear antibióticos (Micoli et al. 2021).

Pese a sus evidentes ventajas, la investigación y desarrollo de técnicas de inmunoterapia resultan más costosas económicamente en comparación con los antibióticos tradicionales, lo que representa un desafío para su empleabilidad a nivel global (Schaft et al. 2023). Además, no son aplicables frente a todas las infecciones ni adecuadas para todos los grupos poblacionales lo que hace necesario mejorar su diseño y producción antes de que puedan ser implementadas (Tan, Li and Zhu 2020).

Capítulo 3
Justificación

3.1 Precedentes que justifican la presente tesis

Tal y como ha quedado patente tras la revisión bibliográfica:

- **La resistencia a los antibióticos**, junto con la ecotoxicidad resultante de su uso indiscriminado, constituyen **uno de los principales desafíos del siglo XXI** a los que tiene que hacer frente la farmacología. La WHO ha emitido numerosas alertas acerca de la gravedad de esta situación, calificándola como una de las amenazas más apremiantes para la salud pública a nivel mundial. Además, destaca la necesidad urgente de adoptar medidas integrales que incluyan el uso racional de antibióticos, la investigación de alternativas terapéuticas y la promoción de políticas públicas que mitiguen tanto la aparición de resistencias antimicrobianas como los efectos ecológicos perjudiciales derivados del empleo de los antibióticos.

- Este complejo escenario se ve empeorado por el **preocupante incremento del consumo mundial de antibióticos**, impulsado tanto por el crecimiento acelerado de la población y la expansión de enfermedades infecciosas, como por el uso extensivo de estos compuestos en actividades productivas. De manera particular, el sector ganadero concentra un porcentaje significativo del consumo total de antibióticos a nivel global, empleándolos no solo para tratar infecciones, sino también como promotores de crecimiento y de manera preventiva en condiciones de producción intensiva.

- Actualmente, la **proliferación de bacterias multirresistentes** ha dado lugar a numerosas infecciones sobre las que no responden eficazmente los tratamientos antimicrobianos convencionales. Esta situación representa un grave retroceso en el manejo de enfermedades infecciosas, limitando las opciones terapéuticas disponibles y aumentando la mortalidad, la morbilidad y los costos asociados a la atención médica. El impacto de este fenómeno no se restringe únicamente al ámbito de la medicina humana, sino que también constituye una amenaza considerable para la medicina veterinaria y la producción ganadera, donde las infecciones resistentes comprometen la sanidad animal, reducen la

productividad y afectan la seguridad alimentaria a nivel global. La creciente presencia de patógenos multirresistentes, tanto en ambientes clínicos como agrícolas, subraya la urgencia de implementar estrategias integradas de control y prevención bajo un enfoque de *"One Health"* que reconozca la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental.

- Tanto los antibióticos empleados en medicina humana como aquellos utilizados en la producción animal son liberados en gran medida al medio ambiente a través de diferentes vías, como las excreciones, las aguas residuales o los desechos agrícolas. Estos compuestos, en muchos casos, no son completamente degradados durante los procesos de tratamiento de aguas o manejo de residuos, lo que facilita su acumulación y persistencia en diversos compartimentos ambientales. Numerosos estudios han documentado **la presencia de concentraciones detectables de antibióticos en suelos y cuerpos de agua superficiales y subterráneos**, con niveles que varían dependiendo del tipo de antibiótico, las prácticas locales de uso y las características de cada región.

- La presencia de antibióticos en el entorno natural ha demostrado provocar **efectos ecotoxicológicos** significativos, alterando profundamente la dinámica de los ecosistemas. A nivel microbiano, estos compuestos actúan eliminando bacterias sensibles, lo que favorece la proliferación de cepas resistentes y modifica la composición y funcionalidad de las comunidades microbianas nativas. Estas alteraciones no solo afectan los ciclos biogeoquímicos esenciales como el ciclo del nitrógeno y el carbono, sino que también disminuyen la capacidad de adaptación y la estabilidad de los ecosistemas. Además, los antibióticos pueden impactar negativamente a organismos no diana, incluidos invertebrados, plantas y vertebrados acuáticos y terrestres, afectando su fisiología, reproducción y supervivencia.

- La liberación ambiental de antibióticos no solo genera efectos de toxicidad directa sobre los organismos expuestos, sino que también desempeña un papel crucial en la **diseminación de bacterias resistentes y de los genes de resistencia** antimicrobiana entre distintos ecosistemas. Esta propagación ocurre mediante mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias, lo que

amplifica la presencia de resistencia incluso en microorganismos previamente susceptibles. Como resultado, la resistencia antimicrobiana se ha consolidado como un problema de alcance global, trascendiendo las fronteras geográficas. En este contexto, resulta imprescindible adoptar un enfoque integral para su abordaje, tal como lo plantea la iniciativa *"One Health".*

- En respuesta a esta creciente crisis sanitaria y ambiental, diversas estrategias internacionales han propuesto la implementación de **medidas urgentes orientadas a frenar la propagación de la resistencia antimicrobiana**. Entre estas iniciativas, se destacan enfoques innovadores que buscan alternativas al uso tradicional de antibióticos, como la terapia basada en bacteriófagos compuestos por virus que infectan y destruyen bacterias específicas, la edición genética mediante tecnologías como CRISPR-Cas, que permite desactivar genes de resistencia en patógenos, y diversas formas de inmunoterapia destinadas a fortalecer las defensas naturales del organismo frente a las infecciones. Estos métodos emergentes ofrecen un prometedor campo de investigación y aplicación clínica, abriendo nuevas posibilidades para enfrentar la amenaza de las infecciones multirresistentes.

- Entre estas estrategias emergentes, una de las más prometedoras es el **uso de compuestos de origen natural**, como los péptidos antimicrobianos, extractos vegetales y metabolitos secundarios de organismos vegetales, debido a su notable diversidad química y su amplio potencial bioactivo. Estos compuestos ofrecen una fuente invaluable de nuevas moléculas capaces de actuar mediante mecanismos distintos a los de los antibióticos tradicionales, lo que disminuye la probabilidad de desarrollo de resistencias. Dentro del abanico de alternativas propuestas para enfrentar la crisis de resistencia antimicrobiana y ecotoxicidad, los productos naturales han sido seleccionados como el punto de partida para la presente tesis doctoral. Esta elección se fundamenta en la extraordinaria diversidad estructural y funcional de estos compuestos, lo cual permite abordar las problemáticas de salud pública y ecológica desde múltiples enfoques, incluyendo la acción antimicrobiana directa, la inhibición de mecanismos de resistencia y la modulación de respuestas inmunológicas.

- No obstante, a pesar del gran potencial que ofrece el uso de productos de origen vegetal como antimicrobianos, también presentan una **serie de limitaciones** que no deben pasarse por alto. En el caso de los compuestos de origen natural, se ha observado una eficacia variable dependiendo del tipo de microorganismo objetivo, la concentración utilizada y las condiciones ambientales. Además, muchos de estos compuestos enfrentan problemas de estabilidad química y biológica, lo que puede dificultar su formulación y aplicación práctica a gran escala. Otro aspecto crítico es la falta de una regulación clara y estandarizada respecto a su seguridad ambiental y toxicidad. De hecho, diversos estudios han evidenciado que algunos productos naturales pueden ejercer efectos adversos sobre organismos no diana, incluyendo bioindicadores clave en la evaluación de la salud ambiental, lo que subraya la **necesidad de realizar análisis ecotoxicológicos** rigurosos antes de su implementación.

3.2 Ventajas de la Propuesta de la tesis: Estrategia de combinación de productos naturales con antibióticos ya comercializados

Por esta razón, **en el marco de la presente investigación, se plantea la exploración de estrategias combinadas que integren productos naturales con antibióticos convencionales.** El objetivo principal de esta aproximación es potenciar la eficacia antibacteriana mediante un efecto sinérgico, lo que permitiría reducir las dosis necesarias de cada agente y, con ello, minimizar tanto los efectos adversos en el organismo como el impacto ambiental derivado de su uso.

Las ventajas de La combinación de productos naturales con antibióticos ya comercializados son múltiples en términos terapéuticos, económicos y ambientales:

1. Esta estrategia no solo busca mejorar el rendimiento terapéutico frente a bacterias resistentes, sino también contribuir a **disminuir la presión selectiva que favorece la aparición de cepas multirresistentes**.
2. Permite una reducción de la dosis necesaria del antibiótico tanto como de los compuestos naturales como de los antibióticos lo que **disminuye** sus posibles **efectos adversos sobre los pacientes**.
3. Optimiza su viabilidad comercial al requerir menores cantidades de materia prima para su producción, favoreciendo así su implementación a gran escala y en contextos con recursos limitados. Así mismo, se **mantiene el uso de fármacos antibióticos** que han requerido un largo proceso de investigación y cuya seguridad y eficacia ya ha sido testada.
4. De manera paralela, la disminución de la dosis de antibióticos tradicionales reduce significativamente la carga ambiental asociada a su uso, **mitigando su ecotoxicidad** y la presión selectiva sobre las bacterias **ambientales no diana**.

La tabla 7 muestra la comparación de las diferentes alternativas propuestas con las ventajas y desventajas teóricas asociadas a su empleo:

Tabla 7: Comparativa entre diferentes alternativas a los antibióticos propuestas

	Productos naturales	Bacteriófagos	CRISP-Cas	Inmunoterapia	Productos naturales + ABs
Eficacia demostrada	✓	✓	✓	✓	✓
Variabilidad de mecanismos de acción	✓	✗	✗	✗	✓
Amplia cobertura (Baja especificidad)	✓	✗	✗	✗	✓
Seguros sobre microbiota	✗	✓	✓	✓	✓
Seguridad en los pacientes	✗	✓	✓	✓	✓
Eficacia en bacterias resistentes	✓	✓	✓	✓	✓
Superación de resistencias bacterianas	✓	✓	✗	✗	✓
Escalabilidad	✗	✗	✗	✗	✓
Viabilidad económica	✗	✗	✗	✗	✓
Mayor seguridad medioambiental	✓	✓	✓	✓	✓

Elaboración propia.

3.3 Aspectos innovadores de la tesis

A pesar del creciente interés por las combinaciones de antibióticos con productos naturales y de la evidencia acumulada sobre su potencial para potenciar los efectos antimicrobianos, **todavía son escasos los estudios que analizan de forma sistemática estas asociaciones, particularmente en lo que respecta a su seguridad ambiental**. Si bien se ha demostrado que algunas combinaciones pueden mejorar la eficacia terapéutica y reducir las dosis necesarias, el conocimiento sobre sus posibles efectos ecotoxicológicos sigue siendo limitado y fragmentario. Hasta la fecha, no se han identificado investigaciones que evalúen de manera específica el impacto ambiental de la combinación de productos naturales con antibióticos, en términos de toxicidad sobre organismos no diana o su comportamiento en ecosistemas acuáticos y terrestres. Esta laguna en la literatura científica constituye el punto de partida de la presente tesis doctoral, que se propone no solo investigar la eficacia antibacteriana de estas combinaciones, sino también aportar evidencia clara sobre su perfil de seguridad ambiental, contribuyendo así al desarrollo de estrategias terapéuticas sostenibles e integradas.

Por tanto, **el carácter innovador de esta investigación radica en su enfoque integral y multidisciplinario, orientado a abordar de manera conjunta dos dimensiones clave del uso combinado de antibióticos y productos naturales: su eficacia antimicrobiana y su impacto ecotoxicológico.** A diferencia de estudios previos que analizan la ecotoxicidad de mezclas de compuestos sin una justificación científica sólida, esta tesis doctoral propone una metodología que parte de un análisis microbiológico exhaustivo para la selección de combinaciones relevantes. Este criterio asegura que los pares de compuestos evaluados no solo posean un interés terapéutico real frente a bacterias patógenas de importancia clínica, sino que también resulten adecuados desde el punto de vista ecológico. La inclusión de una evaluación ecotoxicológica detallada de dichas combinaciones permite obtener una visión integral de los riesgos y beneficios asociados a su uso, lo que amplía significativamente el valor aplicable de los resultados. Así, esta investigación no solo contribuye al conocimiento científico sobre terapias antimicrobianas alternativas, sino que también propone un marco más sostenible y seguro para su posible implementación en contextos clínicos, veterinarios y ambientales.

En este contexto, la presente tesis se sitúa en la intersección entre la microbiología, la farmacología y la ecotoxicología, adoptando una perspectiva integradora que permite abordar el problema de la resistencia antimicrobiana desde múltiples dimensiones. Los hallazgos obtenidos a lo largo de esta investigación tienen el potencial de generar evidencia valiosa no solo para la comunidad científica, sino también para organismos reguladores y responsables de formular políticas públicas. Al proporcionar datos sobre la eficacia y seguridad ambiental de combinaciones de productos naturales con antibióticos, esta tesis puede contribuir al diseño de estrategias más responsables y sostenibles para el uso de antimicrobianos. En última instancia, se espera que este trabajo sirva de base para decisiones informadas que promuevan un enfoque coherente con los principios de la salud global compartida, alineado con el paradigma del *"One Health"*, que reconoce la interdependencia entre la salud humana, animal y del medio ambiente.

Capítulo 4
Hipótesis y Objetivos

La **hipótesis** que se plantea en la presente tesis doctoral es que el uso combinado de compuestos naturales con actividad antimicrobiana y antibióticos sintéticos podría constituir una estrategia eficaz para reducir la aparición de resistencias microbianas, así como para mitigar los efectos adversos sobre el medio ambiente asociados al uso exclusivo de antibióticos de síntesis. Existe la posibilidad de que determinadas combinaciones de ambos tipos de compuestos puedan generar sinergias que potencien la actividad antimicrobiana frente a patógenos clínicamente relevantes, lo que permitiría reducir las concentraciones necesarias de antibióticos sintéticos y, por ende, su impacto ambiental.

Esta hipótesis será contrastada mediante una aproximación experimental estructurada en cinco bloques: (I) evaluación de la toxicidad ambiental de antibióticos sintéticos; (II) identificación de compuestos naturales con actividad antimicrobiana; (III) caracterización ecotoxicológica de dichos compuestos; (IV) análisis de posibles sinergias entre compuestos naturales y antibióticos sintéticos, y su influencia en la generación de resistencias; y (V) determinación de la ecotoxicidad de las combinaciones más prometedoras.

En este contexto, el **objetivo general** de la presente tesis es llevar a cabo un cribado de diversos compuestos naturales de origen vegetal con el fin de evaluar de manera integral sus propiedades antimicrobianas tanto de forma individual como en combinación con antibióticos sintéticos, así como sus efectos sobre el medio ambiente. El propósito último es identificar productos o combinaciones que puedan constituir alternativas eficaces, seguras y ambientalmente sostenibles frente a los antibióticos de síntesis.

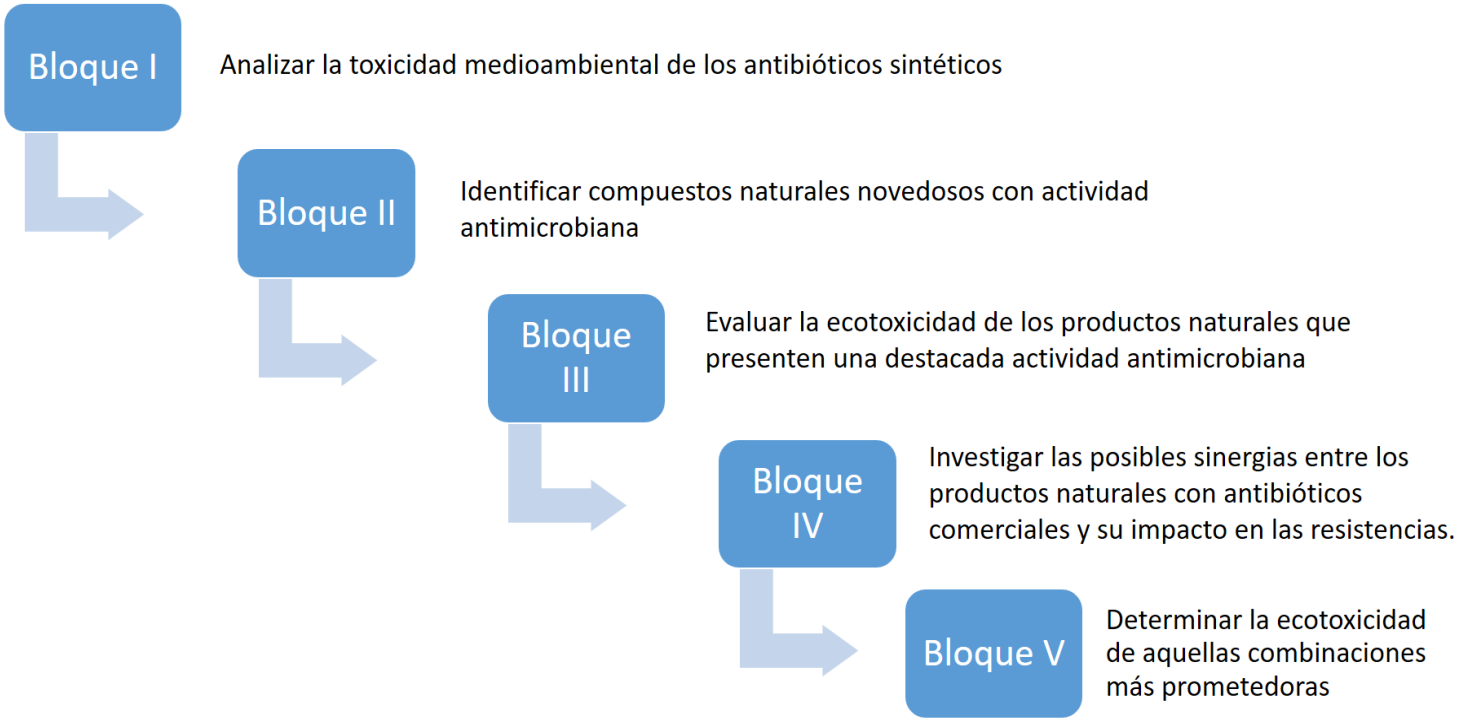
Para alcanzar este objetivo general, se han definido los siguientes objetivos específicos, los cuales serán abordados de forma secuencial (Figura 10):

I. Analizar la toxicidad ambiental de antibióticos sintéticos sobre organismos y comunidades microbianas en ecosistemas acuáticos y terrestres (Bloque I).
II. Identificar compuestos naturales con actividad antimicrobiana frente a microorganismos de relevancia clínica (Bloque II).
III. Evaluar la ecotoxicidad de aquellos compuestos naturales que presenten una actividad antimicrobiana destacada (Bloque III).

IV. Identificar y caracterizar las posibles sinergias entre los compuestos naturales precedentes que presenten baja toxicidad ambiental con antibióticos comerciales de amplio uso, así como su impacto sobre la aparición de resistencias microbianas (Bloque IV).

V. Determinar la ecotoxicidad de las combinaciones más prometedoras que muestren una mejora en la actividad antimicrobiana (Bloque V).

Figura 10: Objetivos secundarios de la tesis doctoral



Elaboración propia.

Capítulo 5

Materiales

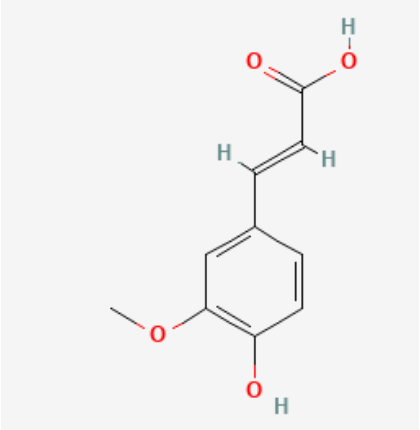
5.1 Selección de los productos naturales

El primer paso a la hora de desarrollar el trabajo experimental fue elegir una serie de productos sobre los que probar su eficacia como antimicrobianos y su toxicidad medioambiental. Los criterios de selección se basaron en la existencia de estudios previos que demostraran cierta actividad antimicrobiana. Se presentan a continuación los compuestos elegidos con sus principales características:

5.1.1 Ácido ferúlico

Se trata de un ácido fenólico ampliamente presente en la familia de las umbelíferas, entre las que se incluyen especies como *Angelica sylvestris* o *Actaea racemosa.* Posee acción antioxidante y antiinflamatoria, siendo capaz de neutralizar el exceso de radicales libres. Entre sus beneficios, ha demostrado propiedades protectores sobre el sistema renal y cardiovascular, inhibiendo la síntesis de colesterol lo que contribuye a prevenir enfermedades relacionadas con la ateroesclerosis (Li et al. 2021). Además de sus propiedades antioxidantes, el ácido ferúlico (AFE) ha demostrado actividad antimicrobiana sobre bacterias gram-negativas como *Acinetobacter baumannii* (Ibitoye and Ajiboye 2019) y *Shigella flexneri* (Kang et al. 2020) y gram-positivas como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Nakauchi et al. 2002). La figura 11 representa la estructura química de este ácido, donde se evidencia la presencia del grupo fenólico y una cadena lateral insaturada. Por otro lado, las principales propiedades fisicoquímicas del AFE empleado en los experimentos (CAS: 537-98-4) se presentan en la tabla 8.

Figura 11: Estructura química del ácido ferúlico

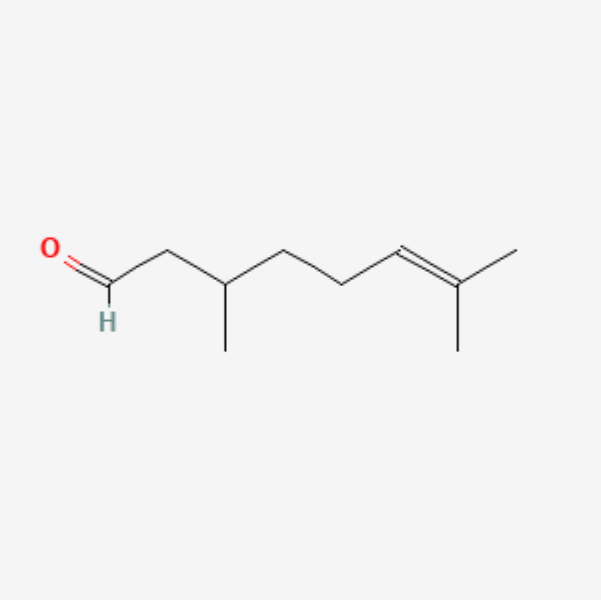


Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid

5.1.2 Citronellal

Se trata de un monoterpeno procedente de extractos vegetales de plantas como *Corymbia citriodora* o *Cymbopogon nardus*. Además de obtención a partir de fuentes naturales, este compuesto puede ser sintetizado químicamente para satisfacer la creciente demanda de diversas industrias. Se emplea principalmente como ingrediente activo en formulaciones insecticidas tópicas destacando por su eficacia en el control de plagas. Asimismo, el citronellal (CAL) es ampliamente utilizado en fragancias por sus propiedades aromáticas distintivas. Estos usos masivos han hecho que su producción anual supere actualmente las 2000 toneladas (Lenardão et al. 2007). Además de ello, investigaciones recientes han demostrado acciones farmacológicas entre las que se incluyen propiedades antioxidantes y cicatrizantes (Sharma et al. 2019) y capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas como *S. aureus*, gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* o *Escherichia coli* y hongos como *Cándida albicans* (Timung et al. 2016, Venancio et al. 2024). La figura 12 representa la estructura química de este compuesto, los extractos naturales están formados por una mezcla racémica de este compuesto donde se incluyen ambos enantiómeros R y S. Finalmente, las principales propiedades fisicoquímicas del AFE empleado en los experimentos (CAS: 537-98-4) se encuentran en la tabla 8.

Figura 12: Estructura química del citronellal

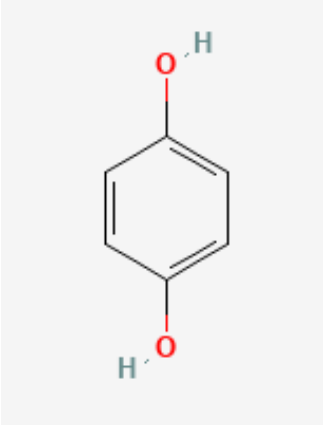


Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citronellal

5.1.3 Hidroquinona

Es un compuesto aromático derivado del benceno que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Se ha identificado en numerosas plantas como *Chimaphila umbellata* o *Vaccinium corymbosum* donde desempeña funciones relacionadas con la protección frente al estrés oxidativo y la defensa frente a patógenos. Además, también se ha detectado en la orina de animales tras la exposición al benceno o al fenol, lo que indica que puede ser producto endógeno fruto del metabolismo de esos compuestos. (Deisinger, Hill and English 1996). A nivel medicinal, la hidroquinona (HQ) posee propiedades blanqueantes que han hecho que haya sido usado durante décadas de manera tópica para tratar distintas enfermedades relacionadas con la hiperpigmentación de la piel como los melasmas, el léntigo solar o las hiperpigmentaciones derivadas de procesos inflamatorios. A nivel industrial tiene una amplia gama de aplicaciones gracias a su poder reductor. Se emplea en revelados fotográficos donde actúa de reductor de haluros de plata o en la producción de polímeros, tintes y otros pigmentos (Fabian et al. 2025). A nivel de actividad antimicrobiana, la HQ ha demostrado capacidad de inhibir el crecimiento de numerosas bacterias distintas, incluyendo cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos como la meticilina (MRSA) o a las β-lactamasas (ESBL-SA) (Ma et al. 2019). La figura 13 representa la estructura química este compuesto donde destacan los dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo bencénico. Por último, las principales propiedades fisicoquímicas de la HQ empleada en los experimentos (CAS: 123-31-9) se encuentran en la tabla 8.

Figura 13: Estructura química de la hidroquinona



Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroquinone

5.1.4 Lisozima

A diferencia de los anteriores compuestos que son metabolitos secundarios de relativamente bajo peso molecular, la lisozima (LS) es una enzima hidrolasa formada por 129 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 14.3 kDa. Es un componente esencial de la respuesta inmunitaria innata, actuando como barrera frente a la exposición a patógenos (Baron et al. 2016). Su distribución es prácticamente universal en los organismos. En los mamíferos, incluidos los seres humanos, la LS está presente en muchas secreciones como las lágrimas, la saliva o la leche materna, así como en tejidos específicos. También se ha detectado en secreciones de otras especies de vertebrados como los peces y en una amplia gama de organismos no vertebrados, como en las vísceras de invertebrados marinos, en la hemolinfa de los insectos, en semillas de numerosas plantas y en bacterias y levaduras. Posee múltiples aplicaciones cosmética, la industria alimentaria y la agricultura relacionada con su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria e inmunomoduladora que la hacen especialmente útil como conservante. A nivel médico se emplea principalmente a nivel tópico en el tratamiento de fístulas y la limpieza de heridas, donde actúa promoviendo la cicatrización y previniendo las infecciones, y en forma de aerosol para tratar enfermedades respiratorias. A nivel antimicrobiano, es especialmente eficaz frente a bacterias gram-positivas como *Enterococcus faecalis* o *S. aureus*, que se encuentren tanto de manera libre como formando parte de biofilms (Gálvez-Iriqui, Plascencia-Jatomea and Bautista-Baños 2020, Ferraboschi, Ciceri and Grisenti 2025). La figura 14 representa la estructura química este compuesto. Por último, las principales propiedades fisicoquímicas de la LS empleada en los experimentos (CAS: 12650-88-3) se encuentran en la tabla 8.

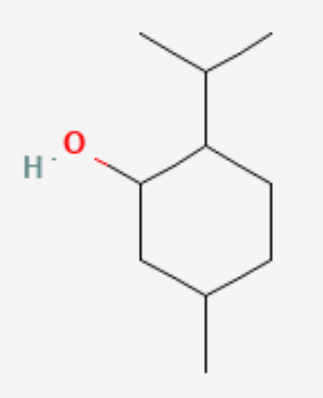
Figura 14: Estructura de la lisozima

Obtenido de: https://www.rcsb.org/structure/1GWD

5.1.5 Mentol

El mentol (MTL) es un monoterpeno empleado con fines terapéuticos cuyo uso se remonta a la medicina tradicional japonesa. Se encuentra principalmente en extractos de plantas del género *Mentha* como la *M. canadensis* o la *M. piperita*; obtenidos por destilación al vapor. En las plantas este compuesto desempeña funciones de defensa contra los herbívoros y de atracción de los polinizadores gracias a sus propiedades aromáticas. Además de la extracción de plantas, puede sintetizarse de manera industrial, lo que facilita su incorporación a una amplia gama de productos. Entre ellos, destaca como ingrediente activo de numerosos cosméticos y pesticidas y como saborizante en chicles, licores, pastas dentales u otros productos de consumo. Con todo ello, se estima que la demanda mundial de este compuesto supera 32000 toneladas anuales (Kamatou et al. 2013, Cheng and An 2025). A nivel farmacológico el MTL posee propiedades antioxidantes, antinflamatorias, inmunomoduladoras y analgésicas. Estas características lo convierten en un compuesto versátil, utilizado en el tratamiento de múltiples trastornos como dolores musculares, cefaleas, inflamaciones gastrointestinales o problemas respiratorios. También se ha demostrado que presenta beneficios sobre la salud psicológica y cognitiva al tener efectos antidepresivos y ansiolíticos (Kazemi et al. 2024). A nivel antimicrobiano posee actividad frente a bacterias gram-positivas como *S. aureus* y *S. pyogenes* y gram-negativas como *E. coli y K. pneumoniae*, lo que ha llevado a su empleo como conservante en diversos productos (Trombetta et al. 2005, Singh, Shushni and Belkheir 2015). La figura 15 representa la estructura química este compuesto donde destacan su naturaleza cíclica y su grupo alcohol en posición axial. Finalmente, las principales propiedades fisicoquímicas del MTL empleado en los experimentos (CAS: 89-78-1) se resumen en la tabla 8.

Figura 15: Estructura química del mentol

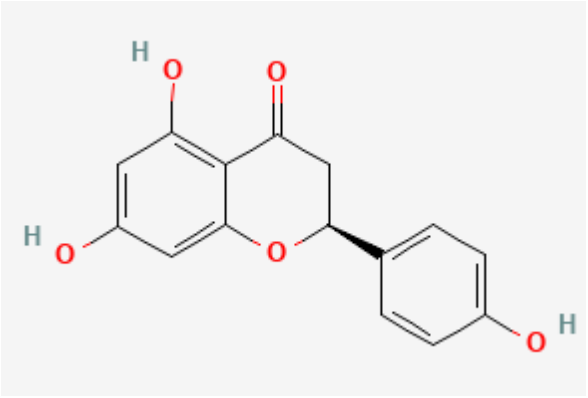


Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol

5.1.6 Naringenina

Se trata de unos de los flavonoides naturales con mayor relevancia médica debido a su amplia gama de actividades biológicas. Este compuesto se encuentra presente en frutos de plantas de diversas especies como *Solanum lycopersicum* o *Ficus carica* entre otras. Diversos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado actividades biológicas prometedoras para el tratamiento de diversas enfermedades debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Las propiedades antioxidantes se relacionan con la eliminación de radicales libres y la prevención de la peroxidación lipídica, además, la naringenina (NAR) puede favorecer la síntesis de enzimas antioxidantes, contribuyendo de este modo a la defensa frente al daño oxidativo. Por su parte, entre las propiedades antiinflamatorias de este compuesto se encuentran la modulación de la expresión y liberación de citoquinas y enzimas proinflamatorias, favoreciendo el tratamiento de enfermedades crónicas como la artritis o las patologías cardiovasculares (Uçar and Göktaş 2023, Salehi et al. 2019). Existen investigaciones que han estudiado la actividad antimicrobiana de este compuesto frente a una amplia variedad de cepas bacterianas obteniendo como resultados que es especialmente eficaz inhibiendo el crecimiento de bacterias gram-positivas como *Listeria monocytogenes* o *S. aureus* (Cai et al. 2023, Céliz, Daz and Audisio 2011). Asimismo, es capaz de hacer frente a infecciones víricas causadas por virus como el SARS-CoV-2 o el de la hepatitis C, gracias a sus acciones inmunomoduladoras que refuerzan la respuesta inmune del paciente (Cai et al. 2023) La figura 16 representa la estructura química este compuesto donde destacan sus grupos hidroxilo. Finalmente, las principales propiedades fisicoquímicas del MTL empleado en los experimentos (CAS: 67604-48-2) se resumen en la tabla 8.

Figura 16: Estructura química de la naringenina

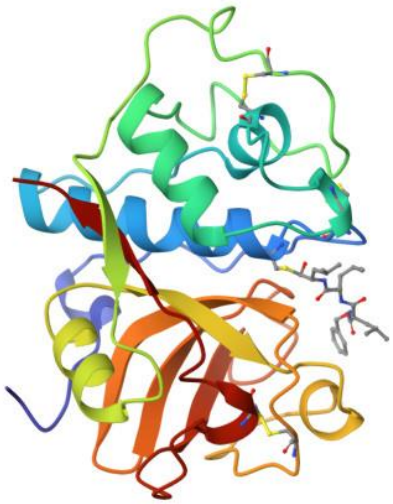


Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin

5.1.7 Papaína

Al igual que la LYS, la papaína (PAP) se trata de una enzima de 24.5 kDa clasificada dentro de las hidrolasas con capacidad para catalizar la ruptura de enlaces peptídicos (Ayodipupo Babalola et al. 2024). Esta enzima se obtiene principalmente de extractos de látex de *Carica papaya,* aunque también se encuentra presente en otras especies vegetales y en varios microorganismos, incluidos ciertos virus (Tacias-Pascacio et al. 2021). Entre los virus se incluye el SARS-CoV-2, donde la papaína fue utilizada como diana molecular en el diseño de tratamientos antivirales (Osipiuk et al. 2021). Desde el punto de vista medicinal, posee propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras que la dotan de diversas aplicaciones terapéuticas. Históricamente, ha sido empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de problemas gastrointestinales como la dispepsia gracias a su papel en la digestión de proteínas y en la reducción de la inflamación del sistema digestivo (Ayodipupo Babalola et al. 2024). A nivel antimicrobiano, la PAP ha demostrado ser una herramienta eficaz para la industria alimentaria debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias gram-positivas como *Bacillus cereus* o *S. aureus* y gram-negativas como *E. coli*, extendiendo de este modo la vida útil de los productos perecederos (Vega-Gálvez et al. 2021). La figura 17 representa la estructura química este compuesto. Finalmente, las principales propiedades fisicoquímicas de la PAP empleada en los experimentos (CAS: 9001-73-4) se resumen en la tabla 8.

Figura 17: Estructura de la papaína

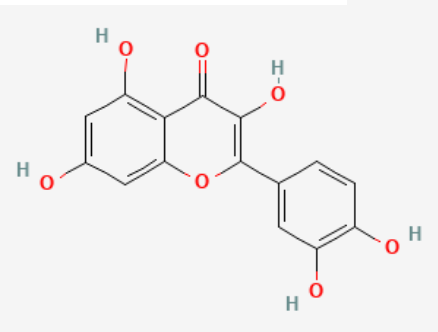


Obtenido de: https://www.rcsb.org/structure/1BP4

5.1.8 Quercetina

La quercetina (QCT) es un flavonoide de origen natural presente en multitud de especies vegetales como *Capparis spinosa* (alcaparra) o *Anethum graveolens* (eneldo) en las cuales puede alcanzar concentraciones de 1 g por cada 100 g de planta sin procesar. En las plantas, este compuesto posee multitud de funciones biológicas relacionadas principalmente con sus actividades antioxidantes. Estas propiedades le permiten proteger a las plantas de diversas formas de estrés abiótico como la radiación ultravioleta o los cambios de salinidad del medio. A nivel medicinal, estas mismas propiedades antioxidantes de la QCT la hacen destacable como suplemento alimenticio. Su capacidad para neutralizar el exceso de radicales libre contribuye a prevenir el daño mitocondrial y la peroxidación lipídica, ayudando a prevenir el envejecimiento y las enfermedades crónicas relacionadas al mismo como la neurodegeneración. Además, también ha demostrado capacidad de modular la respuesta inmune asociada a alergias alimentarias y de reducir la proliferación celular anómala vinculada con ciertos tipos de tumores (Vollmannová et al. 2024, Wang et al. 2022b). Este compuesto también ha demostrado potencial para ser un agente antimicrobiano de amplio espectro con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas como *Streptococcus mutans* o *S. aureus* y gram-negativas como *P. aeruginosa*, así como de hongos como *C. albicans* y virus como el SARS-CoV-2 (Nguyen and Bhattacharya 2022). Es especialmente interesante su capacidad para interferir en la formación de biofilms, de cepas entre las que se incluye *S. aureus* resistente a antibióticos como la meticilina (MRSA) y la vancomicina (VRSA) (Nguyen and Bhattacharya 2022). La figura 18 representa la estructura química este compuesto donde destacan sus dos anillos bencénicos unidos por un anillo heterocíclico de pirona. Finalmente, las principales propiedades fisicoquímicas de la QCT empleada en los experimentos (CAS: 117-39-5) se resumen en la tabla 8.

Figura 18: Estructura química de la quercetina

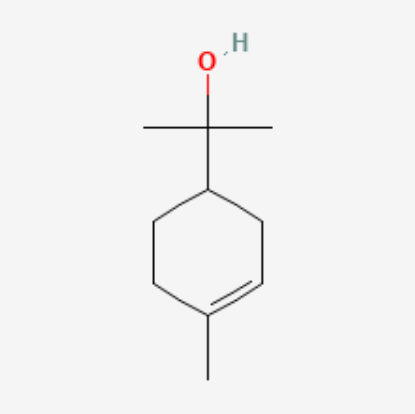


Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin

5.1.9 Terpineol

El terpineol (TER) se trata de un alcohol terciario que pertenece al grupo de los monoterpenos monocíclicos. Se caracteriza por la existencia de distintos isómeros los cuales varían según la posición y configuración del grupo alcohol dentro de la molécula, pero presentando todos ellos propiedades similares. Este compuesto se encuentra de forma natural en diversas plantas como las flores del *Narcissus pseudonarcissus* (narciso), o en las hojas de la *Salvia rosmarinus* (romero). Una de las características más destacadas del terpineol es su agradable aroma, lo que lo convierte en un ingrediente ampliamente utilizado en la industria cosmética, especialmente en la fabricación de jabones y perfumes. Su versatilidad también se extiende a otros productos de cuidado personal y del hogar, como detergentes, donde, además de su capacidad aromática, ha demostrado propiedades insecticidas. Posee igualmente numerosas actividades biológicas entre las que se incluyen efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antihipertensivos y potencialmente anticancerígenos (Khaleel, Tabanca and Buchbauer 2018, Bhatia, Letizia and Api 2008). A nivel antimicrobiano es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una amplia variedad de cepas gram-positivas como *L. monocytogenes* o *S. aureus* (Yang, Chao and Liu 2014), gram-negativas como *E. coli* o *Salmonella* Tyyphimurium (Yang et al. 2014) o levaduras como *C. albicans* (Martorano-Fernandes et al. 2021), pudiendo actuar tanto como compuesto puro de forma aislada o como componente de un aceite esencial (Prerna et al. 2024). La figura 19 representa la estructura química este compuesto, concretamente del α-Terpineol por ser el más abundante donde destaca el grupo alcohol unido a un carbono terciario del anillo monocíclico. Finalmente, las principales propiedades fisicoquímicas del TER empleado en los experimentos (CAS: 8000-41-7) se resumen en la tabla 8.

Figura 19: Estructura química del terpineol



Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alpha-Terpineol

5.1.10 Tabla resumen de las propiedades de los productos naturales empleados

Se presenta a continuación la tabla 8 donde se recogen las principales características de los productos naturales que se van a emplear en la experimentación:

Tabla 8: Principales propiedades de los productos naturales empleados

Producto natural	CAS	Proveedor	Pureza	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad en agua	pKa1/pKa2	Log Ko/w
Ácido ferúlico	537-98-4	Sigma-Aldrich	99%	194.2	Soluble[a]	4.58/9.39[a]	1.51[a]
Citronellal	106-23-0	Sigma-Aldrich	>95%	154.2	Ligeramente soluble[b]	-	3.83[b]
Hidroquinona	123-31-9	Acofarma	99.5%	110.1	73000 mg/L[c]	9.9/11.6[d]	0.59[d]
Lisozima	12650-88-3	Roche	-	14300	-	-	-
Mentol	89-78-1	Sigma-Aldrich	99%	156.3	456 mg/L[e]	-0.81/19.55[f]	3.2[e]
Naringenina	67604-46-2	Sigma-Aldrich	>95%	272.2	475 mg/L[g]	7.05/8.84[g]	2.42[h]
Papaína	9001-73-4	Roche	-	24500	-	-	-
Quercetina	117-39-5	Sigma-Aldrich	>95%	302.2	60 mg/L[i]	7.17/8.26[i]	1.82[j]
Terpineol	8000-41-7	Sigma Aldrich	≤100%	154.2	7100 mg/L[k]	-0.87/19.4[l]	2.67[k]

- Dato no encontrado
Elaboración propia. Varias fuentes.

[a] (National Center for Biotechnology Information, 2025a)
[b] (National Center for Biotechnology Information, 2025b)
[c] (Weaver and Frederikse 1977)
[d] (Suresh, Srivastava and Mishra 2012)
[e] (National Center for Biotechnology Information, 2025d)
[f] (DrugBank Online, 2025a)
[g] (Zhang et al. 2015)
[h] (Joshi, Kulkarni and Wairkar 2018)
[i] (National Center for Biotechnology Information, 2025f)
[j] (Rothwell, Day and Morgan 2005)
[k] (National Center for Biotechnology Information, 2025f)
[l] (DrugBank Online,2025b)

5.2 Selección de antibióticos

Se presentan a continuación los antibióticos seleccionados para estudiar su toxicidad individual, así como sus efectos antimicrobianos y su toxicidad en combinación con los productos naturales. Se han seleccionado antibióticos de uso común en la práctica clínica, tanto en el ámbito de la salud humana como en el veterinario. Se ha priorizado la selección de antibióticos pertenecientes a una amplia variedad de familias, con la finalidad de explorar cómo los diferentes tipos de mecanismos de acción de estos antibióticos interactúan con los productos naturales. Este enfoque permite identificar patrones específicos de interacción, así como evaluar posibles sinergias, antagonismos o modificaciones tanto en la eficacia antimicrobiana como en los perfiles de toxicidad asociados a estas combinaciones. Finalmente, todos ellos pueden ser detectados y cuantificados en el medio ambiente (ver tablas 4 y 5), siendo considerados contaminantes emergentes.

5.2.1 Amoxicilina

Se trata de un β-lactámico derivado de la penicilina, diseñado para superar la resistencia antimicrobiana gracias a la adición de un grupo amino. La AMO posee un amplio espectro de acción, siendo eficaz frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas al inhibir la transpeptidación proteica esencial para la síntesis de la pared celular bacteriana. En la práctica clínica se emplea habitualmente en el tratamiento de infecciones respiratorias, cutáneas y del tracto urinario (Akhavan, Khanna and Vijhani 2023). Actualmente, se administra en la gran parte de las ocasiones junto con ácido clavulánico, que es un inhibidor suicida que se une de manera irreversible a las β-lactamasas bacterianas evitando la hidrólisis de la AMO y potenciando así su eficacia (Huttner et al. 2020). Las principales propiedades fisicoquímicas de la AMO empleada en los experimentos (CAS: 26787-78-0) se resumen en la tabla 9.

5.2.2 Ampicilina

De manera similar a la AMO, la ampicilina (AMP) se trata de un derivado β-lactámico eficaz frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas. Actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular lo que provoca la muerte bacteriana. A nivel médico se emplea en infecciones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales y meningitis bacterianas

(Peechakara, Basit and Gupta 2023). Puede asociarse al inhibidor de la β-lactamasas Sulbactan para potenciar su efecto y superar las resistencias bacterianas (Crass and Pai 2019). Las principales propiedades fisicoquímicas de la AMP empleada en los experimentos (CAS: 69-53-4) se resumen en la tabla 9.

5.2.3 Cloranfenicol

Se trata de un antibiótico perteneciente a la clase de los anfenicoles que es capaz de inhibir el crecimiento de una amplia variedad de cepas bacterianas al actuar inhibiendo la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas de manera irreversible. Debido a su alta toxicidad su uso se reserva a infecciones graves como meningitis bacteriana, fiebre tifoidea e infecciones oculares donde no exista alternativa terapéutica igualmente eficaces (Oong and Tadi 2023). Las principales propiedades fisicoquímicas del CHL empleado en los experimentos (CAS: 56-75-7) se resumen en la tabla 9.

5.2.4 Clortetraciclina

Se trata de un compuesto perteneciente al grupo de las tetraciclinas que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 30S del ribosoma. Es ampliamente en el ámbito de la ganadería para tratar infecciones bacterianas, especialmente en animales rumiantes como los terneros. Además, este compuesto ha demostrado ser eficaz inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos vectores de enfermedades como son los protozoos o las filarias (Cornejo et al. 2018, Yu et al. 2022). Las principales propiedades fisicoquímicas de la CTC empleada en los experimentos (CAS: 57-62-5) se resumen en la tabla 9.

5.2.5 Eritromicina

Se trata de un antibiótico perteneciente a la clase de los macrólidos ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones bacterianas respiratorias. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S de los ribosomas de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Usary and Champney 2001). Su uso también se encuentra aprobado como profilaxis en conjuntivitis neonatal, clamidia, amebiasis intestinal y tratamiento del acné (Farzam, Nessel and Quick 2023).

Las principales propiedades fisicoquímicas de la ERY empleada en los experimentos (CAS: 114-07-8) se resumen en la tabla 9.

5.2.6 Estreptomicina

Este antibiótico fue el primer aminoglucósido identificado y el segundo después de la penicilina. Se emplea principalmente en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram negativas como la brucelosis o la tuberculosis en combinación con otros antibióticos para hacer frente a posibles bacterias resistentes (Waters and Tadi 2023). Actúa uniéndose al 16S rRNA de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, alterando su funcionalidad. Esta interacción provoca errores en la traducción del ARN mensajero, lo que conduce a la producción de proteínas defectuosas (Grosset and Singer 2013). Las principales propiedades fisicoquímicas de la STM empleada en los experimentos (CAS: 57-92-1) se resumen en la tabla 9.

5.2.7 Florfenicol

El FF es un anfenicol muy utilizado en acuacultura y en la medicina veterinaria, especialmente en el tratamiento de infecciones que afecten a animales de granja. Su mecanismo de acción es similar al CHL uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos inhibiendo de este modo la síntesis proteica y la proliferación del patógeno (Guo et al. 2024). Entre las enfermedades más comunes tratadas con FF se encuentran infecciones dermatológicas bacterianas, infecciones gastrointestinales y patologías respiratorias como neumonías de origen bacteriano (Trif et al. 2023). Las principales propiedades fisicoquímicas del FF empleado en los experimentos (CAS: 73231-34-2) se resumen en la tabla 9.

5.2.8 Gentamicina

Es un aminoglucósido de amplio espectro empleado en el tratamiento de infecciones bacterianas graves y potencialmente mortales. Su mecanismo de acción se basa en su capacidad para unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. De esta manera interfiere en la lectura del ARNm durante la traducción dando lugar a proteínas no funcionales (Chaves and Tadi 2023). Su uso está aprobado para hacer frente a bacterias tanto gram-positivas como gran-negativas causantes de enfermedades como

meningitis, septicemia o peritonitis (Chen et al. 2014). Las principales propiedades fisicoquímicas de la GTM empleado en los experimentos (CAS: 1403-66-3) se resumen en la tabla 9.

5.2.9 Neomicina

La neomicina (NMC) es también un antibiótico perteneciente a la clase de los aminglucósidos cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica. Se emplea principalmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales causadas por una amplia variedad de cepas bacterianas. Además, su uso está aprobado en otras patologías como el coma hepático al reducir la producción de amoniaco por las bacterias gastrointestinales responsable de esta condición (Veirup and Kyriakopoulos 2023). Las principales propiedades fisicoquímicas de la NMC empleada en los experimentos (CAS: 1404-04-2) se resumen en la tabla 9.

5.2.10 Oxitetraciclina

Se trata de un compuesto perteneciente al grupo de las tetraciclinas que se emplea en el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente en la salud animal, donde destaca por su uso frecuente en la acuicultura (Leal, Santos and Esteves 2019). Este antibiótico de amplio espectro es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas actuando mediante la inhibición de la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos (Pickens and Tang 2010). Además de su aplicación en medicina veterinaria, se emplea también en la medicina humana, particularmente en el tratamiento de infecciones cutáneas. Destaca también que la OTC ha demostrado efecto antioxidante, antiinflamatorio e inmunomodulador de la respuesta inmune (Malgorzata 2006). Las principales propiedades fisicoquímicas de la OTC empleada en los experimentos (CAS: 2058-46-0) se resumen en la tabla 9.

5.2.11 Penicilina G

Como se ha expuesto en el inicio de la presente tesis doctoral, la penicilina fue el primer antibiótico descubierto que revolucionó la forma en que la sociedad se enfrentó a las infecciones bacterianas. La PENG se trata de un derivado de la penicilina original identificada por Fleming que se empleó clínicamente con éxito (Dumancas et al. 2014).

Es altamente eficaz frente a un gran número de bacterias gram-positivas y algunas gram-negativas, lo que la convirtió en una herramienta crucial en el tratamiento de infecciones bacterianas en las primeras décadas posteriores a su introducción. Sin embargo, el uso prolongado y, en ocasiones, indiscriminado de este antibiótico ha llevado al desarrollo de resistencia en muchas cepas bacterianas, lo que limita su efectividad en la actualidad. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la reacción de transpeptidadción, lo que impide la formación del peptidoglucano de la pared celular debilitando la estructura lo que conduce a la lisis de la bacteria. Actualmente se emplea en infecciones causadas por bacterias sensibles como la difteria o la meningitis (Yip and Gerriets 2024). Las principales propiedades fisicoquímicas de la PENG empleada en los experimentos (CAS: 69-57-8) se resumen en la tabla 9.

5.2.12 Sulfadiazina

La SDZ es un antibiótico perteneciente al grupo de las sulfonamidas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del ácido fólico bacteriano, lo que interfiere en la producción de nucleótidos y, por tanto, en la proliferación bacteriana. Sin embargo, este mecanismo de acción también es responsable de una amplia gama de efectos adversos en los pacientes, lo que ha llevado a una significativa restricción en su uso clínico (Cakir-Koc and Özdemir 2018, Scholar 2007). Por ello su uso se limita al tratamiento de quemaduras tópicas en combinación con iones de plata, aprovechando sus propiedades antibacterianas de amplio espectro para prevenir infecciones, sin la mayoría de los efectos secundarios asociados con su administración sistémica (Oaks and Cindass 2023). Las principales propiedades fisicoquímicas de la SDZ empleada en los experimentos (CAS: 68-35-9) se resumen en la tabla 9.

5.2.13 Tetraciclina

Se trata de un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas con amplio espectro. Actúa previniendo la unión del ARN de transferencia a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Chopra and Roberts 2025). Ha demostrado eficacia frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas. Por tanto, se emplea en el tratamiento de multitud de infecciones respiratorias, gastrointestinales y cutáneas bacterianas (Shutter and Akhondi 2023). Las principales propiedades fisicoquímicas de la TC empleada en los experimentos (CAS: 64-75-5) se resumen en la tabla 9.

5.2.14 Tabla resumen de las propiedades de los antibióticos empleados

Se presenta a continuación la tabla 9 donde se recogen las principales propiedades de los antibióticos empleados en la investigación:

Tabla 9: Principales características de los antibióticos empleados

Antibiótico	CAS	Proveedor	Pureza	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/L)	pKa1/ pKa2	Log Ko/w
Amoxicilina	26787-78-0	Sigma-Aldrich	96-102%	365.4	10.7[a]	2.6[a]	0.87[a]
Ampicilina	69-53-4	Sigma-Aldrich	≥90%	394.4	10100[b]	2.5/7.3[b]	1.35[b]
Cloranfenicol	56-75-7	Acofarma	97.5%	323.1	2500[c]	-2.8/8.69[d]	1.14[c]
Clortetraciclina	57-62-5	Sigma-Aldrich	>99%	478.9	742.8[e]	3.3[f]	-0.72[e]
Eritromicina	114-07-8	Acofarma	95.9%	733.9	2000[g]	8.9[g]	2.6[g]
Estreptomicina	57-92-1	Acofarma	≥97%	581.6	12800[h]	11.1[h]	-2.6[h]
Florfenicol	73231-34-2	Laboratorios Karizoo, S.A	-	358.2	9940[e]	10.73[f]	-0.04[e]
Gentamicina	1403-66-3	Acofarma	≥97%	447.6	12600[i]	12.6/10.1[i]	-1.88[j]
Neomicina	1404-04-2	Laboratorios Karizoo, S.A	-	614.6	250000[k]	9.52/12.9[k]	-3.7[k]
Oxitetraciclina	2058-46-0	Sigma-Aldrich	>99%	496.9	313[l]	3.18[m]	-2.9[e]
Penicilina G	69-57-8	Sigma-Aldrich	96-102%	356.4	210[n]	2.74[n]	1.83[n]
Sulfadiazina	68-35-9	Acofarma	>99%	250.3	77[o]	6.36[o]	-0.09[o]
Tetraciclina	64-75-5	Acofarma	99.2%	444.4	231[p]	3.3/7.68[p]	-1.37[p]

- Dato no encontrado
Elaboración propia. Varias fuentes.

[a] (National Center for Biotechnology Information, 2025h)
[b] (National Center for Biotechnology Information, 2025i)
[c] (National Center for Biotechnology Information, 2025j)
[d] (DrugBank Online,2025c)
[e] (Chan et al. 2020)
[f] (Settimo, Bellman and Knegtel 2014)
[g] (National Center for Biotechnology Information, 2025k)
[h] (DrugBank Online,2025d)
[h] (DrugBank Online,2025d)
[i] (DrugBank Online,2025e)
[j] (National Center for Biotechnology Information, 2025l)
[k] (National Center for Biotechnology Information, 2025m)
[l] (National Center for Biotechnology Information, 2025n)
[m] (DrugBank Online,2025f)
[n] (National Center for Biotechnology Information, 2025o)
[o] (National Center for Biotechnology Information, 2025p)
[p] (National Center for Biotechnology Information, 2025q)

5.3 Selección de microorganismos

Para la realización de los ensayos de actividad antimicrobiológica llevados a cabo en esta tesis se han empleado un total de 15 microorganismos registrados en la colección ATCC ("*American Type Culture Collection*"). En total se han incluido 5 especies de bacterias gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386) y 9 especies bacterianas gram-negativas (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Pasteurella aerogenes* ATCC 27883, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 y *Serratia marcescens* ATCC 13880). Además, se ha seleccionado un hongo (*Candida albicans* ATCC 10231) para comprobar la actividad antifungicida de los productos naturales.

Estas cepas engloban una amplia variedad de patógenos de gran relevancia clínica debido a su capacidad para causar infecciones graves, tanto en el ámbito de la salud humana como en la veterinaria. Dentro de este grupo se incluyen bacterias reconocidas bajo la denominación ESKAPE, que comprende las especies *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter sp*. Estas bacterias no solo son responsables de infecciones intrahospitalarias y comunitarias de difícil manejo, sino que también destacan por su notable capacidad para desarrollar mecanismos avanzados de resistencia antimicrobiana (Venkateswaran et al. 2023). Estas adaptaciones no solo limitan la eficacia de los antibióticos de uso común, sino que también reducen las opciones terapéuticas disponibles, lo que agrava las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a sus infecciones (William and Cesar 2024).

Es por este motivo que la WHO ha identificado a las bacterias ESKAPE como una prioridad crítica en su lista global de patógenos, subrayando la necesidad urgente de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos y estrategias de control para combatirlas de manera efectiva (Mulani et al. 2025). La tabla 10 recoge el grado de prioridad de la WHO para cada una de las bacterias empleadas y su principal patogenia.

Tabla 10: Prioridad WHO y patogenicidad de las bacterias del estudio

GRAM	Cepa bacteriana	Prioridad WHO (WHO 2024)	Patogenicidad clínica	Afectación animal
Positiva	*Bacillus subtilis*	No listada	Oportunista (Gu et al. 2019). Puede causar septicemia, neumonía, endocarditis, infección de heridas, inflamación intraocular y meningitis (Tokano et al. 2023).	No. Empleado como probiótico (Guo et al. 2020).
	Enterococcus faecalis	No listada	Oportunista (Nunez et al. 2022). Puede causar infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis infecciosa, meningitis, infecciones intraabdominales e infecciones de heridas (Said, Tirthani and Lesho 2024).	Sí. Principalmente gastrointestinales (El Zowalaty et al. 2023).
	Listeria monocytogenes	No listada	Puede causar sepsis, meningitis y rombencefalitis, particularmente en huéspedes inmunocomprometidos (Schlech Walter 2019).	Sí. Especialmente en rumiantes puede causar encefalopatías (Nightingale et al. 2004)
	Staphylococcus aureus	Alta (Resistente a meticilina)	Puede causar bacteriemia y endocarditis infecciosa, así como infecciones osteoarticulares, de piel y tejidos blandos, pleuropulmonares y relacionadas con dispositivos externos (Tong Steven et al. 2015).	Sí. Puede causar las mismas infecciones que en humanos (Haag Andreas, Fitzgerald and Penadés José 2019)
	Streptococcus agalactiae	Media (Resistente a penicilina)	Puede causar bacteriemia, infección del tracto urinario, infección cutánea y neumonía (Raabe Vanessa and Shane Andi 2019).	Sí. Puede causar mastitis afectando a animales productores de leche (Tamba et al. 2022)
Negativa	*Acinetobacter baumannii*	Crítica (Resistente a carbapenem)	Oportunista nosocomial (Howard et al. 2012). Puede causar infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones del tracto urinario, meningitis, bacteriemia y neumonía (Morris et al. 2019).	Sí. Puede causar las mismas infecciones que en humanos (Wareth, Neubauer and Sprague 2019)
	Escherichia coli	Crítica (Resistente a carbapenem y a cefalosporinas de 3ª generación)	Estrechamente relacionada con las infecciones del tracto urinario, puede causar meningitis, infecciones de la piel y estructuras cutáneas (Vila et al. 2016) .	Sí. Puede causar las mismas infecciones que en humanos (Welfare et al. 2022).
	Klebsiella aerogenes	Crítica (Resistente a carbapenem y a cefalosporinas de 3ª generación)	Oportunista (González-Montalvo et al. 2024). Puede causar infecciones del tracto urinario, respiratorio y afectar al sistema nervioso central (Gu et al. 2022).	Sí. Puede causar las mismas infecciones que en humanos (Sun et al. 2024).

GRAM	Cepa bacteriana	Prioridad WHO (WHO 2024)	Patogenicidad clínica	Afectación animal
Negativa	*Klebsiella pneumoniae*	Crítica (Resistente a carbapenem y a cefalosporinas de 3ª generación)	Oportunista nosocomial (Abbas et al. 2024). Puede causar neumonía, infecciones del tracto urinario, y sepsis (Bengoechea and Sa Pessoa 2019).	Sí. Puede causar neumonía, mastitis y bacteriemia. Los animales de granja pueden actuar como reservorio (Mario, Hamza and Abdel-Moein 2023).
	Pasteurella aerogenes	No listada	Oportunista (Kuhnert et al. 2000). Puede causar infecciones de tejidos blandos incluyendo endocarditis (Hung et al. 2021).	Sí. Mayor prevalencia que en humanos, especialmente en cerdos y hámsteres a los que causa enfermedades similares a las humanas (Alaygut and Engin 2018).
	Proteus mirabilis	Crítica (Resistente a carbapenem y a cefalosporinas de 3ª generación)	Puede causar infecciones del tracto urinario y también infecciones urinarias asociadas al uso de catéteres(Chakkour et al. 2024).	Sí. Oportunista, puede causar diarrea, neumonía e infecciones del tracto urinario (Chen et al. 2025).
	Pseudomonas aeruginosa	Alta (Resistente a carbapenem)	Puede causar infecciones nosocomiales, que se manifiestan como neumonía, infecciones en heridas quirúrgicas, infecciones del tracto urinario y bacteriemia (Reynolds and Kollef 2021).	Sí. Puede causar queratitis, otitis media y externa y conjuntivitis (Morales-Espinosa et al. 2024).
	Salmonella Typhimurium	Alta (Resistente a fluorquinolonas)	Puede causar infecciones digestivas (Fàbrega and Vila 2013). También ha demostrado causar miopericarditis (Jin et al. 2020).	Sí. Puede causar infecciones digestivas (Hendriksen et al. 2011).
	Serratia marcescens	Crítica (Resistente a carbapenem y a cefalosporinas de 3ª generación)	Puede causar infecciones nosocomiales del tracto urinario, respiratorias y en heridas abiertas (Khanna, Khanna and Aggarwal 2012)	Sí. Oportunista que puede causar mastitis (Friman et al. 2019).
-	*Candida albicans*	No listada	Oportunista, puede causar infecciones en mucosas e infecciones sistémicas (Tsui, Kong and Jabra-Rizk 2016)	Sí. Puede causar las mismas infecciones que en humanos (Domán et al. 2023).

Elaboración propia. Varias fuentes

La elección del empleo de cepas ATCC se basa en las numerosas ventajas que ofrecen en comparación con el empleo de cepas clínicas aisladas directamente de pacientes. Una de las principales ventajas de las cepas ATCC es la estandarización y caracterización genética que presentan, lo que garantiza que los resultados obtenidos sean consistentes y reproducibles en diferentes laboratorios y estudios. Esta uniformidad permite a estas cepas actuar como modelos experimentales internacionalmente reconocidos, cumpliendo con las directrices que marcan los estándares de susceptibilidad antimicrobiana definidos por organismos como el *"Clinical and Laboratory Standards Institute"* (CLSI) o el *"European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing"* (EUCAST) (CLSI 2019, EUCAST 2025).

Además de su carácter estandarizado, las cepas ATCC destacan por su accesibilidad y disponibilidad inmediata a través de catálogos comerciales, lo que simplifica su incorporación en estudios. Este fácil acceso elimina la necesidad de realizar procesos laboriosos y costosos de aislamiento, identificación y purificación, que suelen ser necesarios al trabajar con cepas clínicas aisladas de pacientes. En consecuencia, se reduce el tiempo y los recursos requeridos para iniciar un experimento, permitiendo enfocarse en los objetivos específicos de la investigación.

Otra ventaja de las cepas ATCC es la documentación completa y detallada sobre las condiciones de cultivo que las acompañan, lo que facilita su manejo y garantiza la trazabilidad de los resultados experimentales dotando de uniformidad a los trabajaros realizados en distintas investigaciones.

Todas las cepas empleadas para la realización de los ensayos fueron adquiridas en Thermo Scientific en forma de microorganismos liofilizados contenidos en Culti-loops™. Una vez recibidos, los microorganismos fueron cuidadosamente rehidratados siguiendo las instrucciones del fabricante y preservados a una temperatura de −80 °C en crioviales especializados (Deltalab S.L., Barcelona, España) para garantizar su viabilidad y estabilidad hasta el momento de su utilización en los experimentos. Las condiciones específicas de cultivo, incluyendo el tipo de medio de cultivo, la temperatura y el periodo de incubación, fueron determinadas siguiendo las directrices establecidas por la colección de cultivos ATCC (American Type Culture Collection) para cada una de las cepas utilizadas. La tabla 11 muestra estas condiciones para cada una de las cepas utilizadas.

Tabla 11: Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas empleadas

GRAM	Cepa bacteriana	Código	Medio de cultivo	Temperatura (ºC)	Periodo de incubación (Horas)	Atmósfera
Positiva	*Bacillus subtilis*	ATCC 6633	BHI	30	24	Aeróbica
	Enterococcus faecalis	ATCC 19433		37		
	Listeria monocytogenes	ATCC 7644				
	Staphylococcus aureus	ATCC 9144	TS			
	Streptococcus agalactiae	ATCC 12386	BHI			
Negativa	*Acinetobacter baumannii*	ATCC 19606	NB			
	Escherichia coli	ATCC 25922	TS			
	Klebsiella aerogenes	ATCC 13048	NB	30		
	Klebsiella pneumoniae	C6		37		
	Pasteurella aerogenes	ATCC 27883	BHI			
	Proteus mirabilis	ATCC 35659	TS			
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853				
	Salmonella Typhimurium	ATCC 13311	NB			
	Serratia marcescens	ATCC 13880		26		
-	*Candida albicans*	ATCC 10231	SD	24-26	48	

BHI: *"Brain Heart Infusion Agar/Broth"*: Agar/Caldo de Infusión de Cerebro y Corazón
TS: *"Trypticase Soy Agar/Broth"*: Agar/Caldo de Soja Tripticasa
NB: *"Nutrient Agar/Broth"*: Agar/Caldo nutritivo
SB: *"Sabouraud's Agar/Broth"*: Agar/Caldo Sabouraud
Elaboración propia.

Capítulo 6
Metodología

6.1 Ensayos de ecotoxicidad

Para comprobar la toxicidad tanto de los antibióticos como de los productos naturales que se emplean en esta tesis se llevaron a cabo los siguientes desarrollos experimentales:

6.1.1 Ensayo de toxicidad sobre *Daphnia magna*

D. magna es un pequeño crustáceo de agua dulce perteneciente al orden Cladocera, ampliamente utilizado como organismo modelo en estudios de ecotoxicología. Su relevancia en la evaluación de la toxicidad ambiental se debe a su alta sensibilidad a diversos contaminantes, los cuales pueden afectarle tanto por contacto directo como a través de su mecanismo de alimentación por filtración. Además, su corto ciclo de vida, alta tasa de reproducción y facilidad de mantenimiento en condiciones controladas lo convierten en un bioindicador ideal. Los ensayos de toxicidad realizados con *D. magna* permiten evaluar los efectos de sustancias químicas sobre parámetros biológicos clave, como la supervivencia y la reproducción del organismo (Tiwari et al. 2021), En el presente estudio, se ha empleado este modelo para analizar específicamente los efectos letales de los compuestos mediante pruebas de mortalidad.

Los ensayos de toxicidad sobre *D. magna* se realizaron de acuerdo con las directrices marcadas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) en su guía 202 (OECD 2004), siguiendo los procedimientos operativos estándar descritos en el manual del kit Daphtoxkit FTM magna (1996) proporcionado por Vidrafoc (España) (ref. DM121219). Antes de su uso, el kit fue almacenado a una temperatura controlada de 5 °C para preservar su integridad.

Las ephippia de *D. magna* se sometieron a un proceso de incubación durante 72 horas a una temperatura de 20–22 °C, bajo una iluminación de 6000 lux, utilizando para ello un incubador modelo TOXKIT CH-0120D-AC/DC, suministrado por ECOTEST (España). Tras la incubación, las neonatas recién eclosionadas fueron prealimentadas con una dosis del microalga espirulina 2 horas antes de ser expuestas a las soluciones a ensayar.

Paralelamente se prepararon diferentes soluciones de los compuestos a evaluar en agua dulce sintética, conforme a las especificaciones que se establecen en la norma UNE-EN ISO 6341 (UNE-EN ISO 2012).

El agua dulce sintética se utilizó como control negativo simulando las condiciones naturales en las que vive *D. magna*. Además, el pH de las soluciones preparadas se ajustó a un rango de 7–7.5 mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) preparados previamente a concentración de 0.1 M cuando fue necesario.

Tras las 2 horas de alimentación de las daphnias neonatas, se llevó a cabo la exposición de las mismas a cada una de las disoluciones preparadas empleando una placa de 30 pocillos para cada uno de los compuestos. Cada concentración se ensayó en cinco réplicas por placa, utilizando cinco organismos por pocillo y 10 mL de las disoluciones a estudiar.

Las daphnias fueron expuestos a los compuestos en condiciones de completa oscuridad durante un periodo de 24 a una temperatura constante de 20–22 °C. Tras este periodo de exposición, los organismos que no lograron nadar durante al menos 15 segundos tras una ligera agitación del vial de prueba fueron clasificados como inmóviles.

Los resultados se analizaron calculando la concentración letal media (LC_{50}), definida como la concentración del compuesto que provoca la mortalidad del 50 % de los organismos expuestos.

6.1.2 Ensayo de toxicidad sobre *Aliivibrio fischeri*

A. fischeri es una bacteria luminiscente de origen marino cuyo sistema de bioluminiscencia presenta una alta sensibilidad frente a la presencia de contaminantes, lo que la convierte en un valioso bioindicador en ensayos de toxicidad acuática. Esta especie destaca por su facilidad de cultivo y por ofrecer una respuesta rápida ante la exposición a sustancias tóxicas. El principio del ensayo con *A. fischeri* se basa en la medición de la intensidad de la luz emitida por las bacterias; cuando estas entran en contacto con compuestos tóxicos, su metabolismo se ve alterado, generando una disminución en la emisión luminosa. Esta reducción de la bioluminiscencia puede cuantificarse mediante espectrofotometría luminiscente, lo que permite evaluar de forma

precisa y eficiente la toxicidad de las muestras. La rapidez del ensayo, junto con su capacidad para detectar contaminantes a concentraciones muy bajas, lo convierte en una herramienta valiosa en la evaluación de la toxicidad ambiental (Septer Alecia and Visick Karen 2024).

Los ensayos de inhibición de la bioluminiscencia natural de este microorganismo se llevaron a cabo siguiendo la metodología establecida en el protocolo de toxicidad aguda sobre *Aliivibrio fischeri*, de acuerdo con las especificaciones establecidas en la norma UNE-EN-ISO 11348–3 (UNE-EN-ISO 2007). En este ensayo, se utilizó la cepa NRRL-B-11.177, obtenida de Macherey-Nagel (referencia 945 006) con capacidad para emitir luz.

Las bacterias liofilizadas fueron rehidratadas utilizando la solución de reactivación proporcionada por el fabricante siguiendo de su almacenamiento a 4 °C durante 5 minutos antes de su uso.

Paralelamente, se prepararon soluciones de los compuestos a evaluar a diferentes concentraciones utilizando una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 2 % (v/v) como medio de disolución.

Para evitar que el pH de las soluciones afectara la actividad bacteriana, se llevó a cabo su ajuste dentro del rango de 6 a 8, utilizando para ello soluciones de NaOH y HCl a 0.1 M. El ensayo se realizó en cuadruplicado, empleando 4 viales para cada una de las concentraciones a probar. Además, se utilizó un vial que contenían únicamente bacterias sin exposición a soluciones de ninguno de los compuestos a modo de controles negativos.

El ensayo se inició con la medición de la línea base de la bioluminiscencia de las bacterias rehidratadas, utilizando para ello un luminómetro Biofix® Lumi-10 (Macherey-Nagel), diseñado específicamente para la detección de la luz bacteriana. Posteriormente, se añadieron 0.5 mL de cada una de las diluciones a estudiar a los tubos correspondientes, exponiendo las bacterias a las diferentes concentraciones de los compuestos. La mezcla se incubó durante un periodo de 30 minutos, asegurando condiciones controladas y homogéneas para todas las réplicas.

Tras el tiempo de incubación, se realizó una segunda medición de la bioluminiscencia en los tubos empleando el mismo aparato de medida. La reducción en

la producción de luz bacteriana en comparación con el control negativo fue utilizada como indicador de la toxicidad de los productos.

El criterio de evaluación del ensayo se basó en la reducción de la producción de luz bacteriana, en comparación con el control negativo, expresando el resultado en términos de EC_{50} (la concentración del compuesto que provoca una inhibición del 50 % de la luminiscencia bacteriana).

6.1.3 Ensayo de toxicidad sobre *Eisenia fetida*

E. fetida es una especie de lombriz ampliamente utilizada en estudios de ecotoxicología terrestre, reconocida por su sensibilidad como bioindicador de la calidad del suelo. Su exposición a contaminantes se produce tanto por vía percutánea, facilitada por su epidermis delgada y la presencia de orificios glandulares que permiten una interacción directa con el entorno, como por vía digestiva, al ingerir partículas del suelo durante su alimentación. Esta doble vía de exposición convierte a *E. fetida* en un modelo biológico idóneo para evaluar los efectos de contaminantes en matrices edáficas (Cristina et al. 2022).

Los individuos adultos de *E. fetida* utilizados en este estudio fueron obtenidos de compostadores "Todo Verde" (España). Antes de iniciar los ensayos ecotoxicológicos, las lombrices de tierra fueron sometidas a un proceso de aclimatación de 15 días en un sustrato acondicionado con turba de sphagnum, suministrado por la empresa Spanish Flowers Company (España). Durante la aclimatación se aseguraron condiciones ambientales estables para minimizar el estrés de los organismos. Las condiciones incluyeron una temperatura de 18–25 °C, un pH del sustrato ajustado a 7.5–8, y una humedad relativa del 80–85 %.

Para realizar el ensayo, se seleccionaron únicamente lombrices adultas con características específicas: una edad mínima de 60 días, presencia de clitelo y un peso corporal comprendido entre 300 y 600 mg.

Los ensayos de toxicidad se realizaron siguiendo las directrices establecidas por la metodología de la OECD en el protocolo 207 (OECD 1984). Como sustrato para el ensayo, se utilizó un suelo artificial estandarizado compuesto por una mezcla de arena cuarzítica (Imerys Ceramics España, S.A., España), arcilla caolinítica (Imerys Ceramics

España, S.A., España) y turba de sphagnum (Verdecora Vivarium, España) en una proporción 7:2:1.

Se utilizaron recipientes de polipropileno con una capacidad de 1 litro, provistos de tapas perforadas para permitir la ventilación y minimizar el escape de los sujetos y la pérdida de humedad. Cada recipiente fue llenado con 600 g de este suelo artificial y diez lombrices adultas de tierra. Seguidamente se incorporaron los compuestos disueltos en respectivas soluciones madre a diferentes concentraciones finales de cada uno de ellos. Finalmente, se utilizó agua desionizada en caso de ser necesario para ajustar la humedad del suelo al 35–45 % de su peso seco. Cada concentración fue probada por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Como control negativo, se prepararon recipientes utilizando el mismo procedimiento, pero sin añadir soluciones de compuestos.

Los recipientes se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas durante los 14 días de duración de los ensayos: temperatura de 20 ± 2 °C, humedad relativa del 80–85 % y una intensidad lumínica de 400–800 lux.

Al finalizar el periodo de exposición, se procedió a evaluar la mortalidad de las lombrices en cada uno de los recipientes comparándolos con el control negativo. Los datos obtenidos se analizaron para calcular la concentración letal media (LC_{50}) definida como la concentración de compuesto que provoca la mortalidad del 50 % de las lombrices.

6.1.4 Ensayo de toxicidad sobre *Allium cepa*

A. cepa es una planta frecuentemente empleada en ensayos de toxicidad ambiental, particularmente en la evaluación del impacto de contaminantes presentes en suelos y aguas. Su uso como bioindicador se fundamenta en su elevada sensibilidad a sustancias tóxicas, su facilidad de cultivo y su capacidad para evidenciar alteraciones genotóxicas a nivel celular. El ensayo con esta cebolla permite evaluar la toxicidad mediante la observación del crecimiento radicular y la actividad mitótica en las células de la raíz. La inhibición del crecimiento de las raíces es un indicador temprano de toxicidad, ya que refleja el impacto del contaminante sobre la división celular y el metabolismo de la planta (Camilo-Cotrim et al. 2022).

Los bulbos de *A. cepa* de la variedad *"Stuttgarter Riesen"* con un calibre de 14/21, fueron adquiridos de la empresa Fitoagrícola (España). Antes de los ensayos, se pelaron cuidadosamente los bulbos jóvenes, eliminando las capas externas que pueden presentar restos de impurezas o residuos y asegurándose de no dañar el anillo radicular, para garantizar un crecimiento adecuado de las raíces durante los experimentos.

Los experimentos de toxicidad aguda con esta planta se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Fiskesjö 1993). Los bulbos ya preparados fueron colocados en la parte superior de tubos de 15 mL, utilizando agua mineral VERI (Aguas de San Martín de Veri S.A., España) como medio de crecimiento debido a su contenido adecuado de calcio y magnesio (https://www.veri.es/es/el-producto).

Las pruebas ecotoxicológicas se realizaron con 12 réplicas para cada una de las diferentes concentraciones de cada uno de los antibióticos a probar. Como control negativo, se utilizó agua mineral sin adicionar antibióticos. Los bulbos se cultivaron en una incubadora bajo condiciones controladas de luminosidad, manteniendo una temperatura constante de 25 °C durante 72 horas. Para mantener su efectividad y estabilidad química las soluciones de prueba de los antibióticos se renovaron cada 24 horas.

Tras el periodo de incubación, se midió la longitud de las raíces de los bulbos en cada réplica, comparando los resultados con el control negativo. La inhibición del crecimiento radicular se utilizó para calcular la concentración efectiva media (EC_{50}), que representa la concentración del compuesto que causa una inhibición del 50 % en el crecimiento de las raíces respecto al control negativo.

6.1.5 Ensayos de toxicidad sobre comunidades microbianas

Este ensayo permite analizar cómo las comunidades microbianas utilizan 31 fuentes diferentes de carbono, proporcionando una visión detallada de los cambios en su actividad metabólica, según lo descrito previamente (Pino-Otín et al. 2023a, Nagata et al. 2023, Koner et al. 2021).

Las comunidades microbianas han sido ampliamente reconocidas como bioindicadores sensibles para evaluar el impacto de los micropoluentes en los

ecosistemas fluviales. Su alta capacidad de respuesta a cambios en la calidad del agua y la disponibilidad de nutrientes las convierte en organismos clave para monitorear la salud ambiental y detectar perturbaciones antropogénicas, como la contaminación por metales pesados, plaguicidas, residuos farmacéuticos y compuestos orgánicos persistentes (Liu et al. 2021).

Cualquier alteración en este nivel trófico puede generar efectos en cascada que repercuten en toda la cadena alimentaria (Liu et al. 2021, Zhang et al. 2022a) desencadenando cambios en la estructura y funcionalidad de las comunidades acuáticas. Estas modificaciones pueden afectar desde los niveles microbianos tanto fotosintetizadores como heterótrofos, hasta los organismos de mayor tamaño, como los invertebrados, peces y otros consumidores, con posibles consecuencias impredecibles en el equilibrio ecológico del ambiente acuático (Wang et al. 2023b).

Además de su papel como bioindicadores, los microorganismos desempeñan funciones ecológicas esenciales. Constituyen la base de la red trófica acuática, especialmente entre los productores primarios, al participar en procesos como la fijación de carbono y la producción de biomasa que sustenta a los niveles tróficos superiores. También cumplen un rol fundamental en la degradación y transformación de la materia orgánica, facilitando la remineralización de nutrientes esenciales para el mantenimiento del ecosistema. Asimismo, estos microorganismos tienen una función crucial en el reciclaje de elementos clave como el nitrógeno, el fósforo y el carbono, influyendo directamente en la calidad del agua y en la estabilidad de los ciclos biogeoquímicos. Su capacidad para degradar compuestos contaminantes, incluyendo hidrocarburos, fenoles y metales pesados, les otorga una gran importancia en los procesos naturales de biorremediación, lo que refuerza la necesidad de estudiarlos en el contexto del cambio ambiental y la contaminación (Schoffelen et al. 2019, Wang et al. 2020b).

Comprender la dinámica de estas comunidades microbianas y su respuesta ante distintos tipos de perturbaciones permitirá desarrollar estrategias más eficaces para la conservación y recuperación de los ecosistemas, así como para la evaluación de la calidad ambiental en cuerpos expuestos a actividades humanas.

6.1.5.1 Recolección y procesado de muestras de agua

Las muestras de agua de origen natural para este estudio fueron recolectadas en el río Gállego (Zaragoza, España) siguiendo los procedimientos estándar establecidos por la norma ISO 19458:2006 (AENOR 2007). Estas muestras fueron transportadas al laboratorio cumpliendo con los requisitos de conservación y manipulación para garantizar su integridad. Las muestras se utilizaron para análisis genético, análisis químico y ensayos con Biolog EcoPlates™ (Tiselab S.L., España).

Para los análisis genéticos, se recolectaron los microorganismos presentes en 5 litros de agua del río. El agua fue filtrada utilizando un filtro de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm (Sartorius), montado en un sistema de filtración al vacío. Los microorganismos retenidos en el filtro fueron resuspendidos en un tubo Falcon estéril que contenía 50 mL de solución salina tamponada con fosfato. A continuación, esta suspensión fue centrifugada a 5000 g durante 10 minutos, tras lo cual se descartó el sobrenadante. El pellet resultante, que contenía los microorganismos concentrados, se almacenó a −80 °C para su posterior análisis de secuenciación genética.

Para llevar a cabo los ensayos ecotoxicológicos de los compuestos, se procesó 1 litro de agua del río mediante filtración a través de un tamiz de nailon de 70 µm (BD Falcon) con el objetivo de eliminar partículas y restos sólidos que pudieran interferir en los ensayos. El agua filtrada se almacenó en la oscuridad a 4 °C hasta su uso en los análisis con Biolog EcoPlates™.

Finalmente, el mismo día de la recolección de las muestras, se enviaron 2 litros de agua a los Laboratorios Valero Analítica (Zaragoza, España) para llevar a cabo análisis fisicoquímicos detallados que complementaran los estudios genéticos y ecotoxicológicos.

6.1.5.2 Recolección y procesado de muestras de suelo

Por otro lado, se recolectaron muestras de suelo de un campo de cultivo libre de pesticidas y contaminantes ubicado en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA, www.cita-aragon.es), en Zaragoza, noreste de España. La composición del suelo fue analizada por la Unidad de Suelos y Riegos del CITA.

Para llevar a cabo los análisis genéticos, se procesaron 20 g de suelo mezclándolos con 100 mL de agua estéril. La mezcla fue agitada durante 30 minutos bajo condiciones estériles con el propósito de liberar los microorganismos presentes en el suelo y dispersarlos en la disolución. Tras este paso, la muestra se dejó en reposo durante 1 hora para que las partículas más pesadas sedimentaran y facilitar así la recolección de los microorganismos suspendidos.

Posteriormente, se transfirieron varias alícuotas de 10 mL de la muestra a tubos Falcon, los cuales fueron sometidos a sonicación durante 1 minuto para romper posibles agregados de partículas y microorganismos. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 1000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante fue recolectado en condiciones estériles.

Para aislar los microorganismos presentes en las alícuotas, el sobrenadante fue filtrado empleando un filtro de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm (Sartorius) utilizando un sistema de filtración al vacío. El material retenido en el filtro, que contenía las células microbianas, fue lavado cuidadosamente con una solución salina de PBS esterilizada y finalmente centrifugado a 5000 g durante 10 minutos para concentrar los microorganismos en pellets. Estos pellets obtenidos se recolectaron con un gotero y se almacenaron a −80 °C hasta que se realizó la secuenciación para preservar la integridad de los microorganismos.

Para llevar a cabo los ensayos ecotoxicológicos, se tomaron 10 g de suelo que fueron tamizados a través de una malla con un tamaño de poro de 2 mm (Becton Dickinson, España) para eliminar partículas grandes. A continuación, al suelo pre-tamizado se le añadieron 95 mL de agua estéril, y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos para facilitar la suspensión de los microorganismos. Luego, se dejó reposar la mezcla durante 1 hora para que las partículas de mayor tamaño sedimentaran.

Posteriormente, se transfirieron varias alícuotas de 10 mL de la porción superior de la mezcla a tubos Falcon y se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos para terminar de separar los sedimentos de menor tamaño. El sobrenadante resultante se recolectó bajo condiciones estériles, utilizando tantas alícuotas como fuesen necesarias para garantizar un volumen suficiente de muestra final.

El total de sobrenadante obtenido fue filtrado a través de un tamiz de nailon con un tamaño de malla de 70 µm (Becton Dickinson, España) para eliminar los restos de partículas suspendidas en el suelo. Este procedimiento generó una muestra purificada adecuada para ser utilizada en el resto de los ensayos.

6.1.5.3 Identificación genética de las comunidades microbianas

Los pellets preservados a temperatura de -80ºC obtenidos mediante los procedimientos descritos en las secciones 6.1.5.1 y 6.1.5.2 se emplearon para llevar a cabo el análisis genético de las comunidades bacterianas que habitan en los ecosistemas donde se obtuvieron las muestras. El análisis fue efectuado en las instalaciones de ADM Biopolis Laboratories (Parc Científic, Universitat de València).

El ADN se extrajo utilizando el kit AllPrep® PowerViral® DNA/RNA (QiaGen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la extracción, las muestras de ADN purificado se cuantificaron fluorimétricamente utilizando Picogreen®, y se usaron 1.5 ng de ADN de entrada de cada muestra para amplificar la región V3–V4 del gen 16S rRNA. La PCR específica para V3–V4 consistió en 21 ciclos y se llevó a cabo utilizando la DNA Polimerasa Q5® Hot Start High-Fidelity (New England Biolabs) junto con cebadores a 100 nM.

Después de la amplificación, las bandas derivadas del 16S positivas se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los productos de ADN amplificados fueron diluidos para una segunda ronda de ampliación en la que se empleó segunda PCR de 13 ciclos en presencia de cebadores a 400 nM, pertenecientes a la colección Access Array Barcode Library para secuenciadores Illumina (Fluidigm). Esta segunda reacción tuvo como objetivo completar la construcción de las bibliotecas de secuenciación y etiquetar cada muestra con un código de barras único para facilitar la identificación de los datos durante el análisis.

Una vez completada la preparación de las bibliotecas individuales, se verificaron el tamaño y la concentración de las muestras utilizando una Tape Station (Agilent). Seguidamente se preparó una mezcla equimolar de todas las muestras, la cual fue purificada utilizando perlas AMPure eliminando contaminantes no deseados. La mezcla final fue titulada mediante PCR cuantitativa utilizando el kit "Kapa-SYBR FAST qPCR kit

for LightCycler480" con un estándar de referencia para garantizar la cuantificación precisa de la biblioteca.

El conjunto de amplicones obtenidos fue desnaturalizado antes de ser cargado en un flowcell a una densidad de 10 pM. En el flowcell, se formaron clusters y se llevó a cabo la secuenciación utilizando un "MiSeq Reagent Kit v3", en un secuenciador MiSeq de Illumina, ejecutando una corrida de secuenciación de pares de extremos (2×300 pb).

Los archivos de secuencia en formato fastq se generaron utilizando bcl2fastq, una herramienta integrada en el flujo de trabajo de secuenciación de Illumina. Finalmente, el análisis filogenético y la asignación taxonómica se realizaron mediante la aplicación 16S Metagenomics de Base Space v1.1.0 (Illumina), empleando la base de datos Greengenes (13_5), reconocida por su amplio uso en estudios de comunidades microbianas.

6.1.5.4 Perfil fisiológico a nivel comunitario (CLPP) de microorganismos de agua y suelo

El impacto de los antibióticos y los productos naturales seleccionados en la actividad metabólica de las comunidades microbianas presentes en el agua y el suelo fue evaluado mediante el test Biolog EcoPlate (Tiselab S.L., España). Para ello se prepararon soluciones de los distintos compuestos a evaluar a diferentes concentraciones en un volumen final de 150 µL dentro de los pocillos de una placa Biolog. A estos pocillos se añadió uno de los siguientes tipos de muestra según la finalidad del análisis:

1. Microorganismos de agua de río: Se utilizó agua de río prefiltrada, preparada de acuerdo con el procedimiento detallado en la Sección 6.1.5.1.
2. Microorganismos de suelo: Se empleó el sobrenadante derivado de las muestras de suelo procesadas según lo descrito en la Sección 6.1.5.2.

El pH de las soluciones se ajustó a un rango entre 6 y 7. Cada concentración de cada antibiótico se ensayó por triplicado, y todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar para prevenir contaminación.

Tras la inoculación, las placas de Biolog se colocaron en un incubador a 25 °C durante un periodo de 7 días, manteniéndose en completa oscuridad. Durante todo el periodo de incubación, se mantuvieron estrictas condiciones estériles para preservar la integridad de las muestras y garantizar que los resultados obtenidos fueran reflejo únicamente de los efectos de las concentraciones de antibióticos evaluadas.

La actividad metabólica de las comunidades microbianas se monitorizó midiendo la densidad óptica en una longitud de onda de 590 nm, utilizando un lector de microplacas BioTek™ Synergy H1 Hybrid (Dallas, EE. UU.) equipado con el software Gen5™ para el análisis de datos. Las mediciones se realizaron inmediatamente después de la inoculación para establecer una línea base y posteriormente se tomaron diariamente durante el periodo de incubación de 7 días.

La utilización de las fuentes de carbono en las placas Biolog fue evaluada mediante la reducción del tetrazolio violeta, un indicador redox que cambia de color cuando las comunidades microbianas metabolizan activamente los compuestos de carbono disponibles. Este enfoque, empleado en estudios previos (Pohland and Owen 2009), permite cuantificar de manera precisa los niveles de actividad metabólica de las comunidades microbianas y evaluar cómo se ven afectadas en respuesta a la exposición a los antibióticos. Para facilitar la interpretación de los resultados, los metabolitos fueron clasificados en cinco grupos funcionales según sus características químicas: polímeros, carbohidratos, ácidos carboxílicos y cetónicos, aminoácidos, y aminas y amidas.

6.1.6 Análisis estadísticos y visualización de datos

Para evaluar las curvas dosis-respuesta asociadas con diferentes parámetros biológicos, como la movilidad de *D. magna*, la supervivencia de *E. fetida*, la elongación radicular de *A. cepa* y la luminescencia de *A. fischeri*, se empleó un enfoque estadístico basado en regresión logística logit. Este análisis se realizó utilizando el software XLSTAT (versión 2014.5.03), el cual permitió estimar los valores de LC_{50} (concentración letal media) y EC_{50} (concentración efectiva media) junto con sus respectivos intervalos de confianza.

Los datos obtenidos a partir de los experimentos con mezclas sobre estos bioindicadores fueron evaluados comparando los efectos observados con los efectos esperados de la mezcla, basándose en dos modelos teóricos: la adición de

concentraciones (CA, por sus siglas en inglés) y la acción independiente (IA, por sus siglas en inglés), los cuales asumen el mismo o diferente modo de acción, respectivamente, tal como se describe previamente (Sigurnjak Bureš et al. 2021).

El modelo CA se aplicó siguiendo la Ecuación 1:

$$EC_{pCA} = \left(\sum_i \frac{c_i}{c_{pi}}\right) EC_p \qquad \textit{Ecuación 1}$$

En este caso, EC_{pCA} representa la inhibición teórica del p por ciento, c_i indica la concentración del i-ésimo tóxico en la mezcla de prueba, y c_{pi} denota la concentración del tóxico individual en una solución de un solo tóxico que resulta en una inhibición del p por ciento del microorganismo probado.

Paralelamente, el modelo IA se aplicó empleando la Ecuación 6:

$$EC_{pIA} = [1 - \prod_i (1 - c_i \cdot EC_i)]/c_{mix} \qquad \textit{Ecuación 2}$$

En este caso, EC_{pIA} representa la inhibición teórica del p por ciento asumiendo que c_i es la concentración del i-ésimo tóxico en la mezcla de prueba, ECi denota la inhibición causada por c_i solo en una solución de un solo tóxico, y c_{mix} es la suma de las concentraciones de todos los componentes de la mezcla que se va a probar.

Los resultados obtenidos experimentalmente se compararon con las predicciones de ambos modelos a través de gráficos. Esta comparación permitió identificar posibles interacciones entre los componentes de las mezclas:

Sinergismo: La curva experimental se ubica por encima de las curvas teóricas, indicando un efecto mayor al esperado.

Antagonismo: La curva experimental se encuentra por debajo de las curvas teóricas, reflejando un efecto menor al anticipado.

Aditividad: La curva experimental coincide estrechamente con las curvas teóricas, sugiriendo que los efectos son similares a los esperados.

La actividad microbiana de cada placa Biolog EcoPlate fue cuantificada como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés), siguiendo el método descrito en investigaciones previas (Garland Jay and Mills Aaron 1991). Este parámetro AWCD es un indicador integrado que refleja el nivel de actividad metabólica de las comunidades microbianas en función del consumo de sustratos de carbono específicos en cada pozo de la placa. La ecuación empleada para el cálculo del AWCD se presenta a continuación:

$$AWCD = \sum_{i=0}^{i=7}(OD_{t=xi} - OD_{t=0}) \qquad \textit{Ecuación 3}$$

donde ODi representa el valor de densidad óptica registrado en cada pozo en un tiempo determinado, y ODt=0 es el valor inicial de densidad óptica.

Para analizar la significancia de las diferencias en el AWCD entre las muestras tratadas y el grupo control, se emplearon análisis estadísticos específicos según la naturaleza de los datos. En casos donde los datos no seguían una distribución normal, se utilizó un análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, implementado con el software SPSS (versión 28.0.1.0, 142). Por otro lado, cuando las absorbancias de los metabolitos presentaban una distribución normal, las comparaciones se realizaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes, utilizando nuevamente XLSTAT. Estas pruebas permitieron identificar diferencias significativas en la actividad microbiana bajo distintas condiciones experimentales.

Posteriormente, las curvas de AWCD se ajustaron a un modelo logístico (Ecuación 2) para describir el crecimiento microbiano sigmoideo (Peleg, Corradini and Normand 2007), utilizando el complemento Solver de Excel (Microsoft 365):

$$AWCD = \frac{Cmax}{1+e^{b-rt}} \qquad \textit{Ecuación 4}$$

donde *Cmax* representa la capacidad de carga, es decir, la densidad poblacional máxima alcanzable; *r* es la tasa intrínseca de crecimiento de la población, que describe la velocidad con la que los microorganismos metabolizan los sustratos disponibles; y *b* es un parámetro de ajuste que determina el punto de inflexión de la curva.

6.2 Actividad antimicrobiana

Se presenta a continuación la metodología empleada para llevar a cabo los análisis de actividad antimicrobiana de los productos naturales individuales y de las combinaciones de producto natural y antibiótico empleadas.

6.2.1 Toxicidad de los disolventes

La limitada solubilidad en agua de los compuestos naturales seleccionados hizo necesario realizar una evaluación preliminar para determinar la solubilidad de dichos compuestos en una variedad de disolventes orgánicos. Este análisis no solo permitió identificar los disolventes más adecuados para solubilizar los compuestos, sino también las concentraciones específicas de estos disolventes que eran compatibles con el crecimiento bacteriano normal. Las principales propiedades de los disolventes empleados se encuentran recogidos en la tabla 12.

Tabla 12: Principales propiedades de los disolventes empleados

Disolvente	Abreviatura	CAS	Pureza	Proveedor	Peso molecular (g/mol)	Referencias de uso
Dimetilsulfóxido	DMSO	67-68-5	≥99.7%	Sigma-Aldrich	78.1	(Simsek and Duman 2017, Oliveira et al. 2017, Sim et al. 2019, Adamczak et al. 2020)
Tween 20™	T20	9005-64-5	≥40%	Sigma-Aldrich	1227.5	(Spadini et al. 2024, Rosato et al. 2007)
Tween 80™	T80	9005-65-6	≥58%	Sigma-Aldrich	1310.0	(Moghimi et al. 2016, da Nóbrega Alves et al. 2020)

Elaboración propia. Varias fuentes.

El propósito principal de esta etapa fue asegurar que las condiciones experimentales no introdujeran efectos adversos atribuibles a la toxicidad provocada por los disolventes utilizados. Para ello, inóculos ajustados a la densidad óptica estándar de McFarland de cada uno de los microorganismos se expusieron a una gama de diferentes concentraciones de soluciones de cada uno de los disolventes en placas de 96 pocillos. Se reservó una columna de la placa para evaluar el crecimiento bacteriano normal en ausencia de disolventes y otra para verificar la esterilidad del proceso que fue llevado a cabo empleando una cabina de flujo laminar de seguridad biológica de clase II (Modelo MSC Advantage 1.2) para evitar la contaminación por otros microorganismos.

Seguidamente, las placas inoculadas se incubaron bajo condiciones controladas en una incubadora bacteriológica Incuterm (Trade Raypa®) durante el tiempo requerido por cada microrganismo para experimentar crecimiento. Tras el periodo de incubación, se midió la antibióticosorbancia de los pocillos empleando el lector BioTek™ Synergy H1 Hybrid (Dallas, EEUU) para evaluar el crecimiento microbiano.

Estos datos permitieron identificar las concentraciones máximas de cada disolvente que eran compatibles con un crecimiento microbiológico normal, es decir, comparable al observado en los controles sin disolvente.

6.2.2 Solubilidad de los productos naturales en los disolventes orgánicos

Una vez identificadas las concentraciones máximas de cada disolvente que no interferían con el crecimiento microbiano normal, se procedió a realizar un análisis detallado de la solubilidad de los compuestos naturales en dichas condiciones. Este paso fue fundamental para garantizar que los compuestos fueran disueltos de manera eficiente.

Para llevar a cabo este análisis de solubilidad, se prepararon diversas disoluciones utilizando distintas concentraciones de los compuestos naturales, ajustadas a las concentraciones máximas permitidas de los disolventes. Estas disoluciones se sometieron a un proceso de agitación y se dejaron en reposo durante un periodo de 48 horas.

Después del periodo de reposo, las disoluciones se evaluaron para identificar aquellas que contenían la mayor concentración posible de compuesto natural disuelto en la menor cantidad requerida de disolvente. Las disoluciones preparadas fueron inspeccionadas visualmente con el fin de verificar la ausencia de precipitaciones y garantizar su homogeneidad, asegurando así una distribución uniforme del compuesto en el medio. Este procedimiento se llevó a cabo para reducir al mínimo la presencia de disolventes en los ensayos antimicrobianos y, al mismo tiempo, optimizar la disponibilidad del compuesto activo.

Finalmente, las disoluciones óptimas fueron seleccionadas para evaluar su actividad antimicrobiana en experimentos posteriores.

6.2.3 Ensayo de concentración mínima inhibitoria de los productos naturales

Existen diversos métodos *in vitro* ampliamente utilizados para medir la actividad antimicrobiana de los compuestos individualmente, con propiedades específicas según el objetivo del análisis.

Uno de los métodos más comunes para evaluar la actividad antimicrobiana es el método de difusión de disco sobre agar. Este procedimiento consiste en la inoculación de una placa de agar con una suspensión bacteriana y colocar sobre la superficie un disco de papel impregnado con el compuesto de interés. Posteriormente, se mide la zona de inhibición generada alrededor del disco y se compara con un estándar para determinar si el compuesto posee actividad antimicrobiana. Sin embargo, dado que se trata de un método cualitativo, no permite calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) del crecimiento bacteriano y tampoco es aplicable a todos los compuestos (Valgas et al. 2007). De manera similar, el método de gradiente en agar utiliza una tira impregnada con diferentes concentraciones del compuesto, la cual se coloca sobre el medio de cultivo. Tras la incubación, se observa la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano a lo largo del gradiente. A diferencia del método de difusión en disco, este procedimiento permite determinar la concentración exacta del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano (Gonzalez-Pastor et al. 2023).

Otro método ampliamente utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana es el ensayo de microdilución en caldo. En este procedimiento, los compuestos a analizar se diluyen en un medio líquido a diferentes concentraciones y se añaden a microplacas que contienen una suspensión bacteriana. Tras la incubación, el crecimiento bacteriano se evalúa mediante espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a una longitud de onda específica. Este método es particularmente adecuado para la determinación cuantitativa de la MIC, ya que permite establecer la menor concentración del compuesto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (Balouiri, Sadiki and Ibnsouda 2016). También ofrece varias ventajas en comparación con otros métodos, incluyendo una mayor precisión, reproducibilidad y una amplia aplicabilidad a una variedad de compuestos. Además, permite una mejor estandarización de los resultados, facilita el análisis a gran escala y minimiza la influencia de factores externos, como la variabilidad en la difusión en agar. Debido a estas ventajas, en este estudio se ha empleado el método de microdilución en caldo para la determinación de la MIC en las cepas bacterianas seleccionadas (Salam et al. 2023a).

La determinación de la MIC para cada compuesto se realizó en un entorno estéril siguiendo el **método estándar de microdilución en caldo**, de acuerdo con las directrices establecidas por organismos internacionales. Para bacterias, se adoptaron las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M07-A9, 2018) y la ISO 207776-1 (2019); mientras que, para levaduras, se siguieron las recomendaciones del CLSI, M27-A23 (2017).

Se prepararon microplacas de 96 pocillos con fondo redondo (Deltalab S.L.), cada una conteniendo 100 µL del medio de cultivo específico para el microorganismo bajo estudio (detallado la tabla 10). Seguidamente, a cada pocillo se le añadió 100 µL de una dilución seriada de los compuestos naturales sometidos a análisis.

Posteriormente, estas placas se inocularon con 10 µL de una suspensión microbiana preparada previamente. En el caso de las bacterias, se empleó una suspensión obtenida tras una incubación nocturna, mientras que para las levaduras se utilizó una suspensión de 48 horas. Ambas suspensiones se ajustaron a la densidad óptica estándar de McFarland, logrando una concentración final de aproximadamente $5 \cdot 10^8$ CFU/mL para bacterias y $1 \cdot 10^6$ CFU/mL para levaduras. Estas concentraciones se verificaron utilizando un lector multimodo de microplacas BioTek™ Synergy H1 Hybrid (Dallas, EEUU).

Cada placa incluyó controles positivos, que aseguraron el crecimiento adecuado de los microorganismos bajo condiciones normales, y controles negativos, para verificar la ausencia de contaminación y el mantenimiento de la esterilidad del sistema. Las placas inoculadas se incubaron durante 24-48 horas en una incubadora bacteriológica Incuterm (Trade Raypa®) a la temperatura óptima para cada microorganismo.

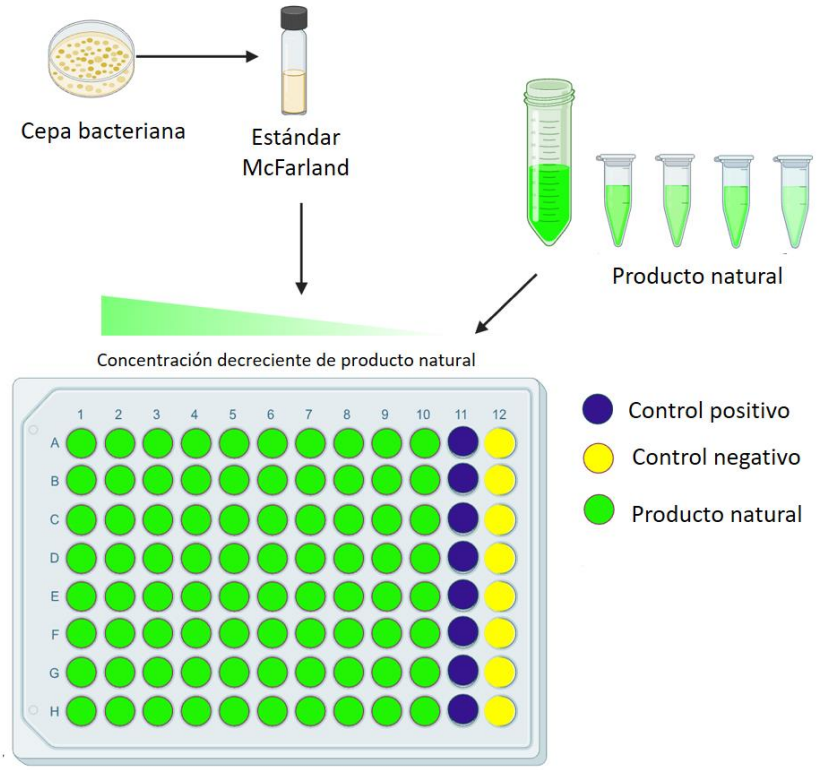
Al finalizar el periodo de incubación, se midió la antibióticosorbancia en cada pocillo utilizando el mismo lector de microplacas. La MIC se definió como la concentración más baja de los compuestos evaluados en la cual la antibióticosorbancia fue equivalente a la del control negativo, indicando la completa inhibición del crecimiento microbiano según las directrices del CLSI (M07-A9, 2018).

Una vez determinada la MIC, para completar el estudio determinando la concentración mínima bactericida (MBC, por sus siglas en inglés), se tomaron alícuotas de 10 µL de los pocillos con concentraciones desde la más alta probada hasta la correspondiente a la MIC. Estas alícuotas se inocularon en placas de agar fresco y se incubaron nuevamente bajo condiciones óptimas. La MBC se definió como la concentración más baja en la cual no se observó crecimiento visible de colonias en el agar, indicando la eliminación completa de microorganismos viables.

Finalmente, el efecto antimicrobiano de los compuestos se clasificó como bacteriostático o bactericida mediante la evaluación de la relación MBC/MIC. De acuerdo con los criterios establecidos en investigaciones previas, un compuesto fue considerado bactericida si MBC/MIC ≤ 4, mientras que valores mayores a este umbral indicaron un efecto bacteriostático (Pankey and Sabath 2025).

La figura 20 muestra una representación del método de microdilución en caldo llevado a cabo.

Figura 20: Representación método micro dilución



Modificado de: Aboagye, F. 2024 (BioRender)

6.2.4 Ensayo de concentración mínima inhibitoria de los antibióticos

Paralelamente y siguiendo el mismo enfoque metodológico, se analizó la actividad antimicrobiana de los antibióticos seleccionados. A diferencia del estudio llevado a cabo con los productos naturales, este análisis se diseñó de manera específica para evaluar su efecto sobre bacterias, excluyendo deliberadamente al hongo *C. albicans* del estudio. Además, los antibióticos se disolvieron únicamente en agua descartando aquellos que no pudieron ser disueltos a las concentraciones requeridas. Esta elección fue estratégica, ya que permitió garantizar la uniformidad en las condiciones experimentales y evitó la introducción de variables adicionales en pasos posteriores de la investigación donde podrían ocurrir interacciones no deseadas entre disolventes de diferentes orígenes químicos. Finalmente, tampoco se llevó a cabo el análisis de la

actividad bacteriostática o bactericida de los antibióticos al estar previamente documentada.

6.2.5 Estudio de las combinaciones entre producto natural y antibiótico

6.2.5.1 Determinación del tipo de actividad combinada

Partiendo del método de microdilución en caldo y siguiendo una metodología similar, se empleó el **método de dilución en tablero de ajedrez (checkerboard assay)** (Palaniappan and Holley 2010, White et al. 1996) para evaluar las interacciones entre dos compuestos administrados simultáneamente sobre las bacterias. Este método permite determinar si la combinación de agentes antimicrobianos genera efectos sinérgicos, aditivos, indiferentes o antagónicos, a través del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI, por sus siglas en inglés), un parámetro fundamental para clasificar el tipo de interacción observada (Leber 2016).

El ensayo se realizó utilizando placas de 96 pocillos que contenían un medio de cultivo bacteriano adecuado para las cepas estudiadas. En cada placa, las diluciones de producto natural se prepararon en serie a lo largo de las filas de manera horizontal, mientras que las diluciones de antibióticos se realizaron de forma vertical a lo largo de las columnas. Ambas diluciones se realizaron a partir de una solución inicial cuya concentración correspondía a cuatro veces el valor de la MIC previamente obtenida para cada compuesto frente a cada bacteria específica. Posteriormente, las placas fueron inoculadas con las suspensiones bacterianas ajustadas al estándar de McFarland, se incubaron bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo, y se midió su absorbancia final. Todo esto se realizó siguiendo rigurosamente los procedimientos establecidos y descritos en detalle en la Sección 6.2.3, asegurando la validez de los resultados obtenidos. Este diseño experimental permitió evaluar de manera sistemática y eficiente las posibles interacciones entre ambos compuestos.

La naturaleza de las interacciones entre los productos naturales y los antibióticos se analizó calculando el índice de concentración inhibitoria fraccional (FICi por sus siglas en inglés) para cada combinación probada. Este índice se definió mediante la siguiente fórmula (Pei, F Zhou and Xu 2009, Vigil et al. 2005):

$$FICi\ index = FIC\ producto\ natural + FIC\ antibiótico = \frac{MIC_{PN,AB}}{MIC_{PN}} + \frac{MIC_{AB,PN}}{MIC_{AB}}$$

Ecuación 5

En esta ecuación $MIC_{PN,\ AB}$ representa la MIC del producto natural en presencia del antibiótico y $MIC_{AB,\ PN}$ representa la MIC del antibiótico en presencia del producto natural.

Los valores de FICi obtenidos se interpretaron según las directrices establecidas por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST por sus siglas en inglés) en el documento de terminología (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious 2000) y de acuerdo a la literatura previa existente (Barbee et al. 2014, Odds 2003):

Efecto sinérgico: FICi ≤ 0.5, indicando una interacción beneficiosa en la que ambos compuestos potencian significativamente su actividad.

Efecto aditivo: FICi entre 0.5 y 1, lo que sugiere que ambos compuestos actúan de manera complementaria, pero sin un aumento significativo de su eficacia.

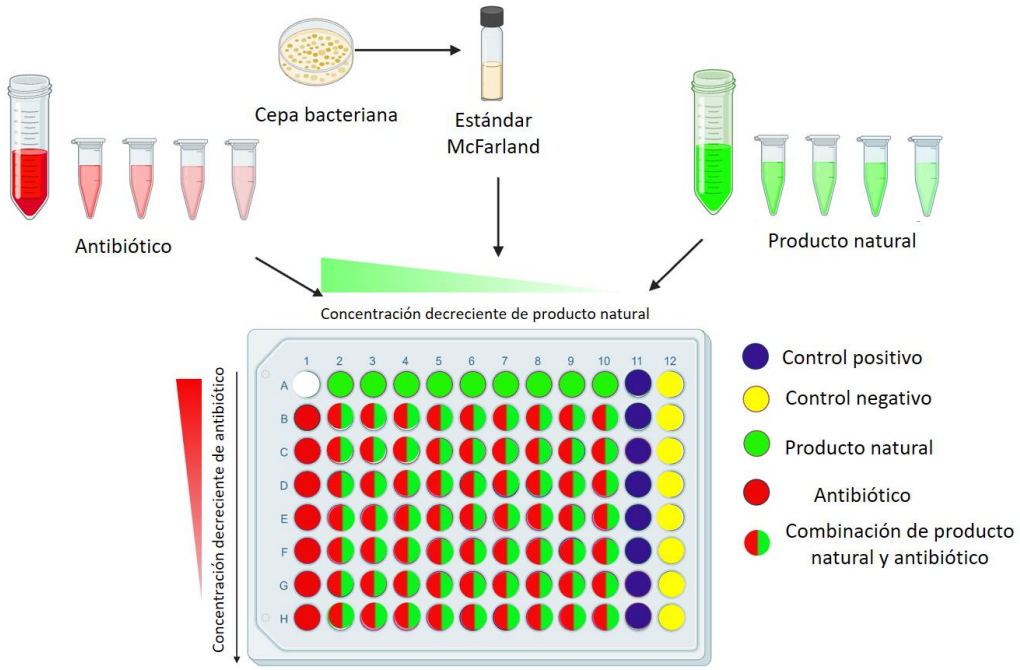
Efecto indiferente: FICi entre 1 y 4, lo que indica que los compuestos no afectan la actividad del otro.

Efecto antagonista: FICi ≥ 4, reflejando una interacción perjudicial en la que uno de los compuestos reduce la eficacia del otro.

Aquellas combinaciones que mostraron un efecto sinérgico (FIci ≤0.5) fueron representadas en forma de isobolograma.

La figura 21 muestra una representación del método de dilución en tablero de ajedrez llevado a cabo.

Figura 21: Representación método dilución tablero de ajedrez



Modificado de: Aboagye, F. 2024 (BioRender)

6.2.5.2 Determinación de las cinéticas de crecimiento de las sinergias

Para determinar la velocidad de inhibición de los compuestos y las combinaciones sinérgicas obtenidas, se realizaron **ensayos cinéticos** en los que se monitoreó el crecimiento bacteriano a intervalos de una hora durante todo el periodo de incubación. Este análisis permitió obtener una visión detallada de la dinámica de inhibición, proporcionando información sobre la rapidez con la que los compuestos afectan la viabilidad bacteriana y el tiempo necesario para alcanzar una inhibición completa. Estos ensayos cinéticos permiten identificar el tiempo óptimo de exposición para lograr una inhibición efectiva del crecimiento bacteriano (Theophel et al. 2014).

La afectación a las dinámicas de proliferación bacteriana por las combinaciones sinérgicas obtenidas fueron evaluadas siguiendo la metodología descrita en estudios previos (Gan et al. 2023). Para ello se utilizaron cultivos bacterianos ajustados al estándar de McFarland a los que se expuso a distintas concentraciones de MIC y subletales del producto natural, el antibiótico y de las combinaciones de ambos en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las placas inoculadas se incubaron a la temperatura óptima para cada cepa bacteriana midiendo la absorbancia en intervalos de 1 hora

durante un periodo de 24 horas. Estas mediciones proporcionaron datos cuantitativos sobre el crecimiento bacteriano a lo largo del periodo de incubación.

Los datos obtenidos fueron representados gráficamente para generar curvas de crecimiento que permitieran analizar la dinámica poblacional en diferentes condiciones experimentales. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados, y los errores estándar fueron calculados utilizando el programa Excel (Microsoft 365).

Para poder comparar cuantitativamente la dinámica de crecimiento bacteriano de los distintos ensayos, las curvas cinéticas obtenidas se ajustaron a un modelo logístico utilizando el software Solver de Excel (Microsoft 365). Este modelo, describe el crecimiento poblacional en función de la siguiente fórmula:

$$Absorbancia = \frac{Cmax}{1+e^{b-rt}} \qquad \textit{Ecuación 6}$$

En esta ecuación C_{max} es la densidad máxima de población alcanzable (capacidad de carga del sistema), que representa el punto de saturación del crecimiento bacteriano, r es la tasa de incremento poblacional, un parámetro que indica la velocidad con la que la población bacteriana crece en las primeras etapas del experimento, b es un parámetro de ajuste relacionado con el tiempo inicial del crecimiento y t es el tiempo transcurrido (en horas) desde el inicio del experimento.

A partir del modelo logístico, se calcularon los valores de *Cmax* y Tm_{50} (el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la capacidad de carga del sistema). Estos parámetros proporcionaron información detallada sobre la cinética de crecimiento bacteriano bajo cada tratamiento, permitiendo evaluar la eficacia de las combinaciones sinérgicas en comparación con los tratamientos individuales y con el control.

Finalmente, para determinar si las diferencias observadas en las curvas cinéticas eran estadísticamente significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para datos paramétricos. Este análisis se llevó a cabo utilizando el software SPSS (versión 28.0.1.0, 142). El análisis permitió identificar el momento temporal a partir del cual aparecían variaciones significativas entre los grupos experimentales y el control, aportando una base estadística sólida para evaluar la eficacia de las combinaciones sinérgicas.

6.2.5.3 Determinación de los efectos bactericidas de las sinergias

Nuevamente, aquellas combinaciones que demostraron un comportamiento sinérgico fueron seleccionadas para un análisis más exhaustivo. Este análisis adicional que se va a describir a continuación, tuvo como objetivo principal determinar los efectos bactericidas que dichas combinaciones podían generar, evaluando su capacidad para eliminar las poblaciones bacterianas.

Estas propiedades bactericidas de las combinaciones sinérgicas se analizaron mediante la exposición de cultivos bacterianos a productos naturales, antibióticos y combinaciones de ambos a concentraciones previamente identificadas como sinérgicas, siguiendo el **ensayo de letalidad bacteriana (*kill curves test en inglés*),** descrito en investigaciones previas (Hu et al. 2002) y considerado el método más adecuado para este propósito. Este ensayo permite cuantificar la reducción de bacterias viables de la población bacteriana a lo largo del tiempo de incubación, proporcionando información clave sobre la capacidad de los compuestos no solo para inhibir el crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático), sino también para erradicar completamente las bacterias (efecto bactericida). Es un método complementario al estudio cinético que utiliza la absorbancia y, por tanto, computa tanto bacterias vivas como muertas no lisadas. Este enfoque metodológico resulta fundamental para profundizar en la comprensión del potencial terapéutico de combinaciones antimicrobianas sinérgicas, especialmente en el contexto del desarrollo de nuevas estrategias para combatir infecciones causadas por bacterias resistentes. La identificación de combinaciones con un alto efecto bactericida es crucial para optimizar tratamientos antimicrobianos y reducir la probabilidad de resistencia, lo que refuerza la importancia de estos ensayos en la investigación microbiológica aplicada (Balouiri et al. 2016).

Para ello se prepararon cultivos bacterianos ajustados al estándar McFarland a los que se expuso a producto natural y antibiótico a las concentraciones que forman las combinaciones sinérgicas tanto por separado, donde se espera que se produzca crecimiento bacteriano, como en asociación, donde se espera que se produzca la inhibición del crecimiento. Cada condición experimental se preparó en un volumen final de 10 mL, y como referencia de crecimiento bacteriano normal, se incluyeron tubos de control que no contenían agentes antimicrobianos.

Las muestras se incubaron a 37 °C durante un periodo de 24 horas para simular las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano. Se tomaron alícuotas de 100 µL en intervalos de tiempo específicos (0, 2, 4, 6 y 24 horas) y se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas en un rango de 10^{-1} a 10^{-7}. Posteriormente, se inocularon 10 µL de cada dilución sobre un medio de cultivo sólido adecuado para la cepa bacteriana estudiada y las placas se incubaron bajo las condiciones óptimas para cada microorganismo. Para garantizar la fiabilidad de los datos obtenidos, todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Tras el periodo de incubación, las colonias formadas en cada dilución fueron contadas cuidadosamente. Los resultados obtenidos se representaron gráficamente como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias (log CFU, por sus siglas en inglés) frente al tiempo transcurrido (h), lo que permitió observar la dinámica de reducción bacteriana y comparar la eficacia de las diferentes condiciones experimentales.

Las combinaciones fueron consideradas sinérgicas cuando el número final de CFU resultante de la combinación era al menos 100 veces menor que las CFU del compuesto individual más activo. Además, los compuestos individuales y las combinaciones de producto natural y antibiótico se clasificaron como bactericidas si el número de CFU finales era al menos 1000 veces menor que el del control. Estos criterios, establecidos según los parámetros descritos previamente (An et al. 2011), proporcionaron una base clara para determinar si un tratamiento combinado poseía un efecto superior al de los tratamientos individuales.

6.2.6 Determinación de los efectos en la generación de resistencias de las sinergias

Finalmente, el estudio del desarrollo de resistencias frente a las combinaciones sinérgicas obtenidas se llevó a cabo mediante el procedimiento del paso continuo de bacterias cultivadas en concentraciones subinhibitorias **pasaje seriado (*serial passage en inglés)*** siguiendo una metodología adaptada de estudios previos (Pollard et al. 2012, Wang et al. 2022a). Este método se basa en exponer las bacterias a concentraciones subinhibitorias de los compuestos y monitorear si su tolerancia aumenta con el tiempo. A través de este enfoque, fue posible analizar la evolución de la resistencia

bacteriana a lo largo de múltiples generaciones, evaluando si las combinaciones sinérgicas podían retrasar, reducir o incluso prevenir la aparición de resistencia (Martínez, Baquero and Andersson 2011). Además de determinar la presencia o ausencia de resistencia adquirida, este método permitió calcular la velocidad con la que emergen las variantes resistentes. (Andersson 2015).

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon soluciones por separado de los antibióticos y de los productos naturales a dosis superiores a las MIC. En placas de 96 pocillos, se añadieron 100 µL de caldo de cultivo y 100 µL de las disoluciones preparadas previamente diluyéndolas en serie. En el caso de las combinaciones sinérgicas, solo los antibióticos fueron diluidos en serie partiendo de una concentración mayor a la MIC en la sinergia, mientras que el producto natural empleado se mantuvo a una concentración fija a la dosis que presentaba en las sinergias con el antibiótico correspondiente.

A continuación, se añadieron 100 µL de un inóculo bacteriano preparado a partir de una dilución 1:100 de un estándar de McFarland 0.5. Este diseño experimental permitió asegurar la exposición de las bacterias a concentraciones supra y subinhibitorias. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se determinó nuevamente la MIC del antibiótico y el producto natural por separado y de la combinación de ambos, utilizando un lector de placas BioTek™ Synergy H1 Hybrid (Dallas, EEUU).

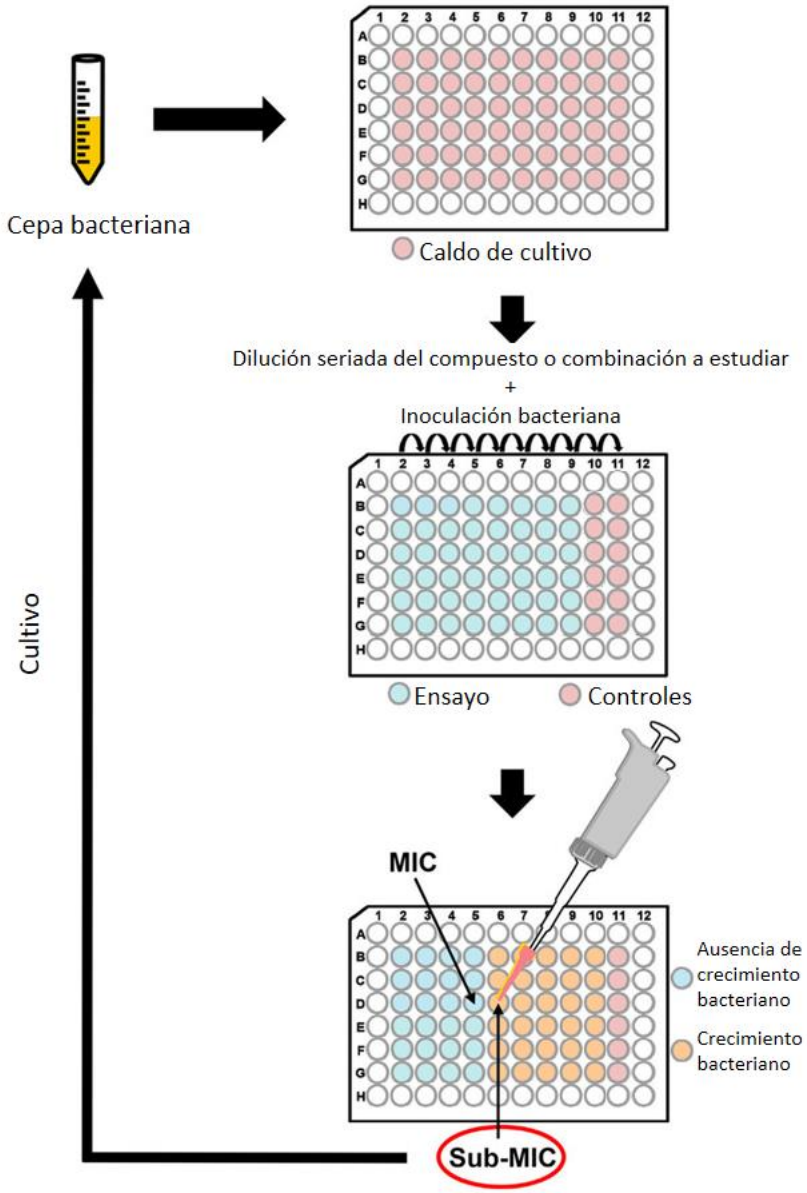
Este proceso se repitió diariamente durante un periodo de 30 días, utilizando como inóculo las bacterias procedentes del primer pocillo que mostró crecimiento visible (equivalente a la concentración de 1/2 MIC). En cada ciclo, se evaluaron las nuevas MIC, que podía permanecer constante o incrementarse a medida que las bacterias eran sometidas a la presión de los agentes antimicrobianos.

Finalmente, el día 30, las bacterias cultivadas en los pocillos correspondientes a la concentración de 1/2 MIC fueron sembradas en placas de agar, y tras un periodo de incubación, se realizó una última determinación de la MIC para evaluar si la resistencia generada durante el periodo de exposición podría revertirse al eliminar la presión selectiva ejercida por los compuestos. Esto permitió examinar no solo la aparición de resistencia, sino también la estabilidad de la misma en ausencia del agente antimicrobiano.

La resistencia bacteriana se definió como un incremento de al menos 4 veces en el valor inicial de la MIC. Este criterio es ampliamente reconocido en estudios de resistencia antimicrobiana (Clark et al. 2009, Farrell David et al. 2011), ya que refleja una alteración significativa en la sensibilidad bacteriana frente a los compuestos evaluados.

La figura 22 muestra una representación del método de diluciones seriadas llevado a cabo.

Figura 22: Representación método diluciones seriadas



Modificado de: (Wang et al. 2017)

Capítulo 7
Resultados

7.1 BLOQUE I: Ecotoxicidad de antibióticos

Este primer apartado de resultados presenta un análisis ecotoxicológico exhaustivo que evalúa el impacto de diversos antibióticos sintéticos sobre organismos bioindicadores, así como sobre las comunidades microbianas que habitan en ecosistemas acuáticos y terrestres. De esta manera, se da cumplimiento al primer objetivo secundario planteado para esta tesis doctoral:

> **OBJETIVO I:** "Analizar la toxicidad ambiental de antibióticos sintéticos sobre organismos y comunidades microbianas en ecosistemas acuáticos y terrestres".

Los resultados experimentales presentados a continuación corresponden al estudio descrito en el artículo titulado:

Pino-Otín, M., Valenzuela, A., Gan, C., Lorca, G., Ferrando, N., Langa, E., Ballestero, D., 2024. Ecotoxicity of five veterinary antibiotics on indicator organisms and water and soil communities. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 274. (Q1, Factor de Impacto:6.1)

En este artículo se presentan los resultados de un estudio detallado sobre la ecotoxicidad de cinco antibióticos veterinarios de uso extendido: CTC, FF, NMC, OTC y SDZ, utilizando cuatro bioindicadores representativos de ecosistemas terrestres y acuáticos. Para los sistemas acuáticos se emplearon *D. magna* y *A. fischeri*, mientras que en los entornos edáficos se utilizaron *E. fetida* y *A. cepa*. Paralelamente, se examinó el impacto de estos antibióticos sobre comunidades microbianas naturales provenientes de agua fluvial y suelo agrícola, utilizando técnicas de secuenciación del gen 16S rRNA para el análisis de diversidad microbiana, así como perfiles funcionales metabólicos mediante Biolog EcoPlates™.

Este artículo se puede consultar completo en el **Anexo 1.1**.

7.1.1 Resumen

En este estudio se evaluó la ecotoxicidad de diferentes antibióticos lo que permitió analizar una amplia gama de impactos ecotoxicológicos, tanto a nivel de organismos modelo como de comunidades microbianas presentes en sistemas acuáticos y edáficos. Los antibióticos presentaban clases farmacológicas diferentes: la CTC y OTC pertenecen a las tetraciclinas, ampliamente empleadas en la ganadería intensiva (Leal, Santos and Esteves 2019); el FF es un análogo del CHL de uso exclusivo veterinario con un perfil ambiental relevante (Guo et al. 2024); la NMC es un aminoglucósido de uso tópico y oral con acción bactericida (Veirup and Kyriakopoulos 2023); y la SDZ es una sulfonamida común en terapias combinadas, especialmente en medicina porcina (Oaks and Cindass 2023).

El diseño experimental, la ejecución de los ensayos y el análisis de datos se centraron prioritariamente en estos cinco compuestos, que constituyen el eje principal de los resultados discutidos en este primer bloque de la tesis. No obstante, estos resultados forman parte de una línea de investigación más amplia, en la que se abordó el estudio ecotoxicológico de otros antibióticos también empleados en esta tesis, que incluye AMO, AMP, CHL, ERI, STM, GTM, PENG y TT. Estos resultados se incluyen en el Anexo 1.2 (Pino-Otín et al. 2023a, Pino-Otín et al. 2022a).

El valor añadido de este primer bloque de investigación radica en el enfoque sistemático adoptado para evaluar la toxicidad ambiental de un conjunto representativo de antibióticos sintéticos, tanto de uso veterinario como humano. Esta estrategia permite abordar de manera integral un problema ambiental complejo, caracterizado por la creciente presencia y persistencia de estos compuestos en distintos compartimentos del medio ambiente debido a su uso masivo y, en muchos casos, su eliminación incompleta durante los procesos de tratamiento de aguas y residuos orgánicos. El análisis conjunto de antibióticos de diferentes clases y aplicaciones terapéuticas proporciona una base sólida para comparar su impacto relativo sobre organismos bioindicadores y comunidades microbianas, permitiendo así identificar patrones de toxicidad comunes y compuestos de mayor riesgo ecológico.

A diferencia de estudios anteriores recogidos por la bibliografía, que suelen centrarse en compuestos individuales o en efectos ecotoxicológicos aislados, esta

investigación aborda de forma integrada la complejidad de los efectos que estos contaminantes emergentes pueden ejercer sobre organismos y comunidades en distintos niveles biológicos y ecológicos.

El estudio comprende un análisis ecotoxicológico exhaustivo basado en indicadores biológicos clave, pertenecientes a distintos niveles tróficos, seleccionados estratégicamente para representar organismos relevantes de ecosistemas terrestres y acuáticos. Esta selección incluye modelos clásicos de toxicidad, como *D. magna*, *A. fischeri, E. fetida* y *A. cepa*, que permiten detectar respuestas sensibles y reproducibles ante la exposición a fármacos, garantizando así la comparabilidad con estudios previos y marcos regulatorios.

Paralelamente, el trabajo incorpora una evaluación toxicológica centrada en comunidades microbianas naturales de origen fluvial y edáfico, las cuales han sido caracterizadas mediante herramientas de biología molecular. Este análisis no se limita a descripciones taxonómicas, sino que se ha implementado un estudio funcional, orientado a detectar posibles alteraciones en la capacidad metabólica de estas comunidades para procesar distintos tipos de sustratos. Este enfoque basado en el estudio de perfiles metabólicos, proporciona una medida directa del impacto ecológico de los antibióticos, más allá de la mera presencia o ausencia de determinados taxones.

Este nivel de análisis permite abordar preguntas clave relacionadas con la resiliencia ecológica, la estabilidad funcional de los ecosistemas y la posibilidad de efectos subletales persistentes sobre procesos esenciales como el ciclo del carbono o la degradación de materia orgánica. De este modo, se contribuye significativamente a llenar vacíos relevantes en el conocimiento actual sobre los efectos de los antibióticos como contaminantes ambientales, especialmente en lo relativo a su acción sobre la biodiversidad microbiana y la funcionalidad del ecosistema.

Asimismo, el estudio se complementa con un análisis comparativo respecto a investigaciones previas, lo que ha posibilitado una actualización y consolidación del marco teórico. Esta labor de síntesis aporta una visión ampliada y rigurosa del estado del arte en el ámbito de la ecotoxicología, especialmente en lo que respecta al impacto de residuos farmacéuticos sobre la dinámica y funcionalidad de los ecosistemas naturales.

La elección de antibióticos ampliamente utilizados en la práctica veterinaria, combinada con la inclusión de una amplia gama de sistemas biológicos representativos de distintos niveles ecológicos y compartimentos ambientales, confiere a este estudio un elevado grado de aplicabilidad en contextos reales de gestión ambiental.

En este sentido, este primer bloque de resultados se erige como la base estructural sobre la que se desarrollan las siguientes etapas experimentales de la tesis; Por una parte, nos permite comparar grados de ecotoxicidad entre estos antibióticos sintéticos y los productos naturales con actividad antimicrobiana que queremos identificar; por otra la determinación de valores cuantitativos de toxicidad para cada antibiótico ensayado constituye el punto de partida para la posterior investigación sobre el comportamiento ecotoxicológico de combinaciones entre antibióticos sintéticos y productos naturales. En consecuencia, este apartado no solo documenta los efectos tóxicos de los antibióticos sobre el medio ambiente, sino que también cumple una función introductoria que permite contextualizar e interpretar adecuadamente los resultados ecotoxicológicos presentados en los capítulos sucesivo.

7.1.2 Información específica sobre material y métodos

El análisis de ecotoxicidad de los antibióticos se ha realizado siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1. La tabla 13 recoge las concentraciones de cada antibiótico empleadas en cada uno de los ensayos realizados:

Tabla 13: Concentraciones de antibióticos empleadas en ensayos de toxicidad

Ensayo	Antibiótico	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5
D. magna	CTC	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	300 µg/mL	400 µg/mL
	OTC	200 µg/mL	300 µg/mL	400 µg/mL	500 µg/mL	600 µg/mL
	FF	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
	NMC	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
	SDZ	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
A. fischeri	CTC	6.25 µg/mL	12.5 µg/mL	25µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
	OTC	7.8 µg/mL	15.6 µg/mL	31.2 µg/mL	62.5 µg/mL	125 µg/mL
	FF	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
	NMC	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	2000 µg/mL	2500 µg/mL
	SDZ	12.5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
A. cepa	CTC	0.03 µg/mL	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL	300 µg/mL
	OTC	0.03 µg/mL	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL	300 µg/mL
	FF	0.03 µg/mL	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL	300 µg/mL
	NMC	0.03 µg/mL	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL	300 µg/mL
	SDZ	0.03 µg/mL	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL	300 µg/mL
E. fetida	CTC	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
	OTC	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
	FF	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
	NMC	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
	SDZ	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
Comunidades microbianas acuáticas y terrestres	CTC	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-
	OTC	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-
	FF	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-
	NMC	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-
	SDZ	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-

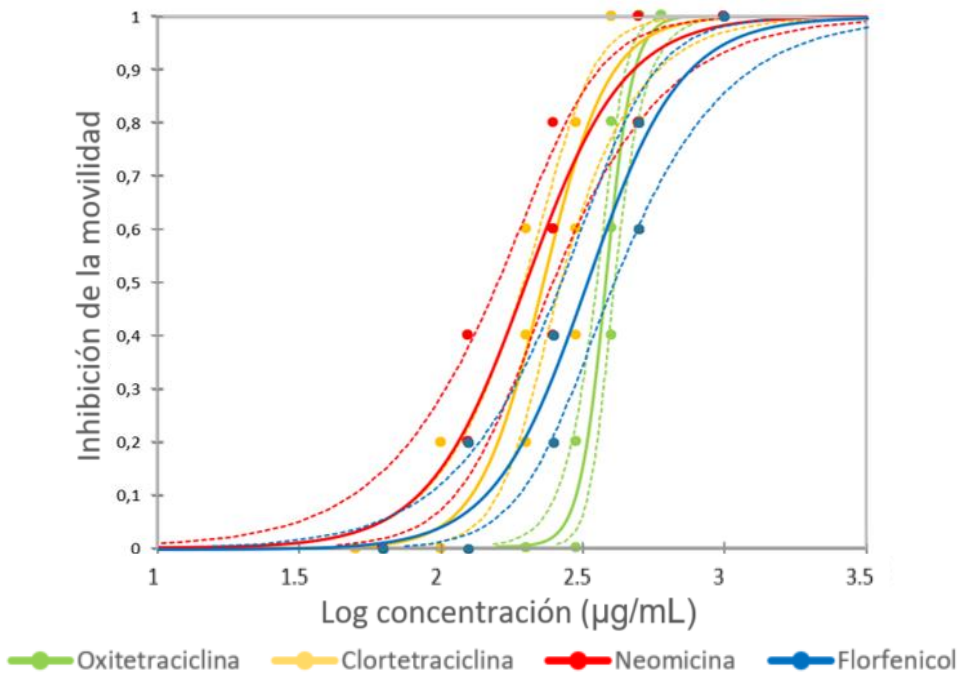
Elaboración propia.

7.1.3 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *D. magna*

La Figura 23 presenta las curvas de respuesta a las dosis obtenidas para *D. magna* tras 24 horas de exposición a los cinco antibióticos empleados. Se observó un efecto dosis-respuesta claro y consistente en cuatro de ellos, con rangos de valores de LC_{50} muy similares entre ellos. SDZ no se incluye en la representación gráfica, ya que no generó ningún efecto significativo a concentraciones inferiores a 1000 µg/mL.

Los valores específicos de LC_{50} para cada antibiótico se encuentran detallados en la Tabla 14, donde se observa que la toxicidad, ordenada de mayor a menor (en términos de valores LC_{50} expresados en µg/mL), sigue el patrón: NMC > CTC > FF > OTC > SDZ. Esto implica que NMC es el compuesto más tóxico dentro del rango de concentraciones estudiado, mientras que SDZ es el que presenta menor toxicidad.

Figura 23: Toxicidad de los antibióticos sobre D. magna tras 24h de exposición



Curva dosis-respuesta para D. magna tras 24h de exposición a Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Neomicina y Florfenicol. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

Tabla 14: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para los antibióticos empleados sobre los indicadores seleccionados

Antibiótico	*D. magna* (µg/mL)		*A. fischeri* (µg/mL)		*E. fetida* (mg/Kg)		*A. cepa* (µg/mL)		Comunidad microbiana agua (µg/mL)		Comunidad microbiana suelo (µg/mL)	
	LC_{50} (24h)	LC_{10} (24 h)	EC_{50} (30´)	EC_{10} (30´)	LC_{50} (14 d)	LC_{10} (14d)	EC_{50} (72h)	EC_{10} (72h)	LC_{50} (120h)	LC_{10} (120h)	LC_{50} (120h)	LC_{10} (120h)
Clortetraciclina	229.65[(1)] (195.39-264.24)	128.00 (84.54-158.23)	15.63 (14.72-16.65)	5.83 (5.17-6.51)	>1000	94.4 (8.7-290.1)	174.16 (146.31-210.52)	3.21 (2.54-4.08)	11.74 (10.35-32.87)	5.89 (0.24-7.82)	4.61 (1.63-7.31)	0.71 (0.04-1.83)
Oxitetraciclina	383.17[(2)] (354.83-409.63)	302.11 (254.50-331.22)	24.90 [(4)] (23.16-26.73	6.24 (5.23-7.07)	>1000	>10	>300	-	<10	<0.10	2.44 (0.03-6.88)	0.02 (0.01-0.30)
Florfenicol	326.45 (263.57-406.30)	141.63 (87.84-186.11)	>1000 [(5)]	-	>1000	>1000	>300	-	<10	<0.10	14.90 (9.73-21.02)	1.44 (0.53-2.68)
Neomicina	200.61[(3)] (159.44-249.53)	83.76 (49.30-112.66)	2587 (2533-2660)	2073 (1995-2131)	>1000	>10	97.44 (83.26-115.19)	1.21 (1.44-2.30)	36.69 (26.53-50.04)	4.21 (2.04-7.03)	45.86 (25.54-75.73)	0.61 (0.08-1.95)
Sulfadiazina	>1000	563.26 (251.00-760.31)	>200	-	>1000	>1000	>300	-	<10	<0.10	0.22 (0.03-4.31)	0.00 (0.00-0.00)

[(1)] LC_{50} (24h) = 380.1 (Park and Choi 2008b)
[(2)] LC_{50} (24h) = >100 (Wollenberger, Halling-Sørensen and Kusk 2000)
>400 (Zounková et al. 2011)
22.64 (Isidori et al. 2005)
>800 (Park and Choi 2008b)
[(3)] LC_{50} (24h) = 116.6 (Park and Choi 2008b)
[(4)] LC_{50} (30') = 64.50 (Isidori et al. 2005)
108 (Kołodziejska et al. 2013)
121.01 (Lalumera et al. 2004)
[(5)] LC_{50} (30') = 29.4 (Kołodziejska et al. 2013)
Elaboración propia.

Las tetraciclinas representan una amenaza significativa para *D. magna* debido a su capacidad de atravesar las membranas de células eucariotas de mediante difusión pasiva, facilitada por su naturaleza lipofílica (Tabla 9). Estas moléculas son lo suficientemente pequeñas y apolares para disolverse en la bicapa lipídica de las células, lo que les permite atravesar el citoplasma y ejercer sus efectos tóxicos a nivel intracelular

(Kounatidis et al. 2024). En particular, la CTC empleada en esta investigación posee una mayor lipofilia que la OTC, lo que se traduce en una mayor eficiencia para penetrar en membranas celulares.

Además, de la difusión pasiva, las células eucariotas poseen un sistema de transporte mediado por proteínas que puede facilitar el movimiento de sustancias como las tetraciclinas a través de las membranas. Un ejemplo destacado son los transportadores de aniones orgánicos, que han demostrado estar implicados en la captación de tetraciclinas en ciertos tipos celulares (Kobayashi et al. 2005). Este mecanismo de transporte, combinado con la capacidad de las tetraciclinas para interactuar con las membranas celulares por sí mismas, permite que estas moléculas alcancen concentraciones nocivas en el interior de las células, contribuyendo de este modo a su toxicidad en *D. magna*.

La toxicidad de las tetraciclinas también está influida por su actividad antimicrobiana. Estas moléculas no solo afectan a las células eucariotas de manera directa, sino que también pueden alterar indirectamente la fisiología de *D. magna* al impactar en su microbiota intestinal. Como organismo filtrador, este organismo está expuesto a antibióticos presentes en el medioambiente a través del tracto digestivo (Akbar et al. 2020). Estudios previos han señalado que la alteración de la biota intestinal causada por las tetraciclinas puede provocar desequilibrios metabólicos, afectando a procesos clave para este organismo como la reproducción, el gasto energético y la capacidad de supervivencia a largo plazo (Lovern and Van Hart 2022).

Finalmente, se ha documentado que concentraciones de tetraciclinas inferiores a las que producen letalidad (LC_{50}) son capaces de reducir significativamente la capacidad reproductiva de *D. magna*. Estudios previos han mostrado estos efectos inhibidores de la reproducción a concentraciones de 86 µg/mL (Zounková et al. 2011), o incluso 46.2 µg/mL (Wollenberger et al. 2000). Estos hallazgos subrayan la importancia de evaluar también las concentraciones subletales de los antibióticos en los ecosistemas acuáticos, ya que estas pueden generar impactos ecológicos significativos.

Por su parte, el efecto tóxico del FF observado en *D. magna* es comparable al de las tetraciclinas, aunque los mecanismos involucrados pueden ser diferentes. Si bien las tetraciclinas como OTC y CTC se caracterizan por su alta lipofilia, el FF presenta una lipofilia moderada (Tabla 9), lo que le confiere una mayor versatilidad para interactuar

tanto con ambientes lipídicos como acuosos. Este comportamiento permite que el FF se distribuya en diferentes compartimentos del organismo, favoreciendo su biodisponibilidad. Esta característica, al facilitar su interacción tanto con medios lipídicos como acuosos, puede contribuir a un mayor potencial tóxico en determinadas condiciones, aunque dicho efecto depende de múltiples factores fisicoquímicos y biológicos y no exclusivamente de su grado de lipofilia (Morak-Młodawska et al. 2023).

Otra similitud radica en el amplio espectro de acción de este antibiótico. Aunque no se han encontrado estudios previos sobre el tema, es probable que el FF también pueda impactar la biota intestinal de D. magna, contribuyendo indirectamente a sus efectos tóxicos. Estos impactos combinados pueden tener consecuencias en la capacidad de alimentación, reproducción y supervivencia del organismo.

Por otro lado, la NMC es notablemente más tóxica para *D. magna* en comparación con las tetraciclinas (como OTC y CTC) y FF. A pH fisiológico, NMC posee múltiples grupos amino protonados, lo que le confiere una carga positiva neta (Singh et al. 2020). Esta propiedad química permite que interactúe fuertemente con moléculas cargadas negativamente, como lípidos de membranas celulares, ARN y proteínas. Estudios han demostrado que los aminoglucósidos como la NMC pueden unirse a regiones específicas del material genético eucariota, alterando la regulación de procesos celulares esenciales, como la traducción y la síntesis de proteínas (Ranjan and Arya 2023, Kaul and Pilch 2002), lo que podría desencadenar disfunciones metabólicas graves en *D. magna* explicando así su elevada toxicidad detectada.

En contraste, la SDZ ha demostrado una toxicidad considerablemente menor al resto de antibióticos investigados sobre *D. magna*. Este comportamiento puede atribuirse a su mecanismo de acción, que se basa en interferir en rutas metabólicas altamente específicas de las bacterias, particularmente en la síntesis de ácido fólico. La SDZ actúa como un análogo estructural del ácido para-aminobenzoico (PABA), compitiendo con éste e inhibiendo la enzima dihidropteroato sintetasa. De esta manera se bloquea la producción de ácido fólico y, en consecuencia, se interrumpen procesos fundamentales para el crecimiento y la replicación bacteriana (Ovung and Bhattacharyya 2021). Este proceso es exclusivo de los organismos procariotas, ya que los organismos eucariotas, incluido *D. magna*, no dependen de la síntesis de ácido fólico endógena, sino que obtienen este compuesto directamente de su dieta (Ke, Mathias and Green 2003).

Esto hace que el mecanismo de acción de SDZ sea demasiado específico para las bacterias, lo que limita sus efectos directos en *D. magna.*

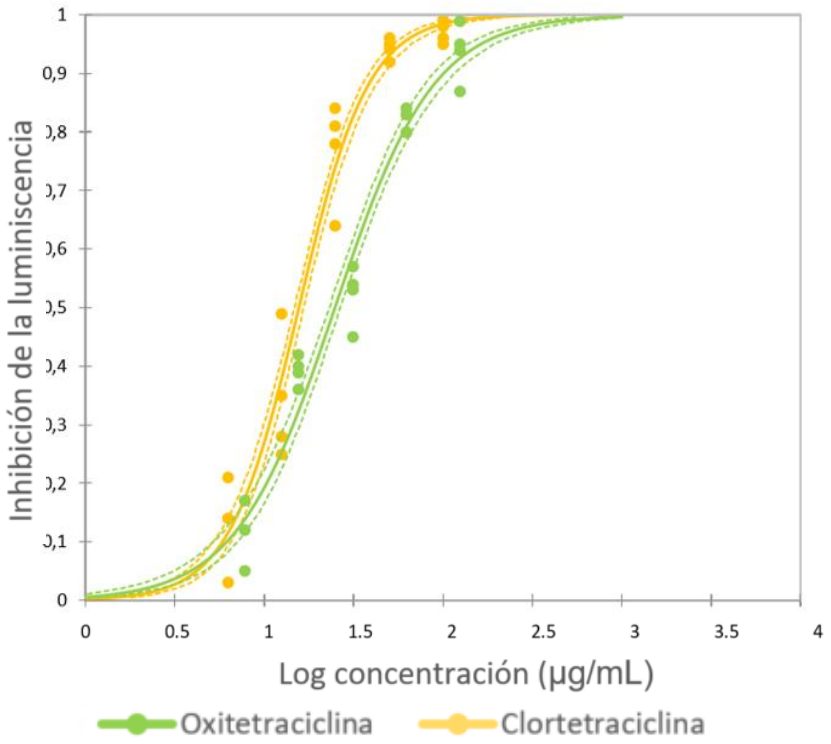
Sin embargo, aunque SDZ tiene un impacto directo limitado en *D. magna*, su toxicidad podría manifestarse de forma indirecta a través de la alteración de la microbiota intestinal. Como antibiótico de amplio espectro que actúa contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, SDZ puede eliminar bacterias beneficiosas en el tracto digestivo de *D. magna*, afectando su metabolismo y capacidad de digestión. Este impacto en la biota intestinal podría generar efectos subletales, como una disminución en la eficiencia alimentaria y energética, lo que, a largo plazo, podría influir en la reproducción, el crecimiento y la supervivencia del organismo (Kim et al. 2019).

7.1.4 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *A. fischeri*

Las curvas de dosis-respuesta de la bacteria *A. fischeri* expuesta durante 30 minutos a ambas tetraciclinas se representan en la Figura 24. Estos datos muestran una clara relación entre la concentración de las tetraciclinas y el efecto tóxico observado, lo que subraya la sensibilidad de *A. fischeri* a este grupo de antibiótico.

Por su parte, en la tabla 14 se puede ver que FF, NMC y SDZ no mostraron toxicidad significativa en *A. fischeri* dentro del rango de concentraciones evaluadas, ya que sus valores de LC_{50} superaron las concentraciones máximas analizadas indicando una toxicidad significativamente menor o limitada en las concentraciones probadas.

Figura 24: Toxicidad de los antibióticos sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición



Curva dosis-respuesta para A. fischeri tras 30 minutos de exposición a Clortetraciclina y Oxitetraciclina. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

La diferencia de toxicidad que se ha encontrado entre las tetraciclinas y el resto de antibióticos empleados podría explicarse a partir de los mecanismos de acción y las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos.

Las tetraciclinas, como son la OTC y la CTC, son antibióticos de amplio espectro que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas al unirse específicamente a la subunidad 30S del ribosoma (Chopra and Roberts 2025). La sensibilidad de *A. fischeri* a estos compuestos se debe a que sus ribosomas poseen el sitio de acción de las tetraciclinas y carecen de mecanismos de resistencia que impidan su acción (Duscher et al. 2018, Ge et al. 2024).

Además de su mecanismo de acción, la naturaleza lipofílica de las tetraciclinas les permite atravesar las membranas celulares bacterianas mediante difusión pasiva. Este proceso es más eficiente en bacterias gram-negativas debido a la presencia de porinas en su membrana externa, que facilitan el paso de moléculas pequeñas y moderadamente lipofílicas. Asimismo, elevada proporción de ácidos grasos saturados en las membranas de bacterias gram-negativas contribuye a la eficacia de la difusión pasiva

permitiendo la acumulación de estas moléculas en el citoplasma bacteriano alcanzando concentraciones suficientes para inhibir la síntesis de proteínas de manera efectiva (Thanassi, Suh and Nikaido 1995). Como se ha explicado en el apartado anterior, aunque tanto la OTC como la CTC comparten propiedades lipofílicas, CTC tiene una mayor lipofilia debido a su estructura química (Tabla 9). Esto incrementa su capacidad para interactuar con la bicapa lipídica, mejorando su penetración en las membranas bacterianas. En comparación, OTC, aunque todavía lipofílica, tiene una interacción más limitada con las membranas, lo que explica su menor toxicidad relativa frente a CTC en este organismo bioindicador.

En contraste, los antibióticos FF, NMC y SDZ evaluados en las mismas condiciones no muestran un impacto significativo sobre *A. fischeri* en las concentraciones probadas. A pesar de que su acción está dirigida contra procesos bacterianos esenciales, sus propiedades fisicoquímicas y posibles mecanismos de resistencia limitan su capacidad para ejercer toxicidad sobre esta bacteria gram-negativa.

A. fischeri también posee la diana sobre la que actúa el FF (subunidad 50S del ribosoma bacteriano) inhibiendo la síntesis de proteínas. Sin embargo, su lipofilia moderada (Tabla 9) podría no ser suficiente para atravesar las porinas de su membrana externa de manera eficiente. Además de ello, se ha reportado que algunos géneros bacterianos como éste presentan mecanismos de resistencia específicos a este antibiótico mediado por bombas de eflujo que lo expulsan antes de que alcance concentraciones tóxicas intracelulares (Kadlec, Kehrenberg and Schwarz 2007, Li et al. 2020b), lo que podría explicar su baja toxicidad observada en esta especie bacteriana.

Por su parte, como se ha expuesto anteriormente, el gran tamaño molecular y la naturaleza hidrofílica de la NMC limitan su capacidad para atravesar la membrana externa de bacterias gram-negativas mediante difusión pasiva y ejercer su acción antibacteriana. Las limitadas capacidades de este antibiótico para alcanzar su sitio de acción en el ribosoma bacteriano explican la baja toxicidad que presenta en *A. fischeri*, incluso a concentraciones relativamente altas.

Finalmente, la falta de toxicidad significativa de SDZ en *A. fischeri* puede atribuirse a su estructura química a pH fisiológico, que muestra una limitada capacidad para interactuar con las membranas bacterianas. Además, su mecanismo de acción, aunque efectivo en bacterias susceptibles, podría ser menos relevante en *A. fischeri*

debido a la presencia de mecanismos compensatorios o de resistencia metabólica que minimizan la necesidad de síntesis de ácido fólico mediante la ruta metabólica que inhibe la SDZ.

7.1.5 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *E. fetida*

Ninguno de los cinco antibióticos evaluados en *E. fetida* mostró signos de toxicidad significativa, ya que los valores de LC_{50} obtenidos fueron superiores a 1000 mg/kg, indicando una baja toxicidad aguda de estos compuestos para esta especie en las condiciones evaluadas. Sin embargo, en algunos casos específicos, como el de la CTC, se pudo estimar el valor de LC_{10} (Tabla 14). Es importante destacar que, aunque los valores de LC_{50} fueron consistentemente altos, se observaron efectos aislados a concentraciones más bajas como cambios en el grosor y el tamaño de las lombrices. En los casos de CTC, OTC y NMC, se registraron una o dos muertes de lombrices a una concentración de 100 mg/kg. Este resultado podría indicar que ciertos individuos dentro de la población pueden ser más sensibles a estas sustancias.

Los resultados de toxicidad obtenidos para las tetraciclinas empleadas coinciden con observaciones previas reportadas en la literatura. Por ejemplo se ha documentado que un suelo contaminado con OTC a una concentración de 100 mg/kg, preparado con micorrizas y maíz, no produjo mortalidad en *E. fetida* (Cao, Ji and Wang 2015). Además, se ha evidenciado que las tetraciclinas pueden inducir respuestas subletales relevantes en este organismo como alteraciones morfológicas significativas tras una exposición de 15 días a OTC (Zhao et al. 2019). En términos de comportamiento, se ha documentado que concentraciones de OTC superiores a 1000 mg/kg provocan una respuesta de evitación significativa en *E. fetida*, que se desplaza hacia áreas no contaminadas (Gao et al. 2016). Este comportamiento defensivo ante condiciones ambientales adversas puede tener implicaciones ecológicas importantes, ya que la redistribución espacial de estas lombrices podría alterar procesos clave del ecosistema, como la descomposición de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes (Medina-Sauza et al. 2019). Asimismo, se han documentado efectos adversos en la reproducción de otros oligoquetos terrestres expuestos a OTC, los cuales ocurren a concentraciones inferiores a las necesarias para provocar efectos letales, considerando que los valores de Ec_{50} reproductivos reportados superan los 3000 mg/kg (Baguer, Jensen and Krogh 2000), lo que refuerza la idea de

que los efectos subletales pueden manifestarse a concentraciones considerablemente más bajas que las necesarias para inducir mortalidad.

A nivel molecular, se ha demostrado que las tetraciclinas pueden generar estrés bioquímico y daño al ADN en *E. fetida*. Estos efectos han sido asociados con la activación de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la catalasa, que reflejan una respuesta al estrés oxidativo provocado por la exposición a la CTC (Dong et al. 2012b, Lin et al. 2012). Asimismo, se ha observado daño en la integridad de las membranas lisosomales y un aumento en la apoptosis de celomocitos tras la exposición a OTC, lo que sugiere una posible afectación inmunotóxica (Gao et al. 2015). Por otra parte, estudios proteómicos han revelado que la OTC altera la expresión de proteínas estructurales como la actina, afectando directamente al citoesqueleto celular comprometiendo funciones esenciales como la motilidad y la integridad estructural de las células (Gao et al. 2016).

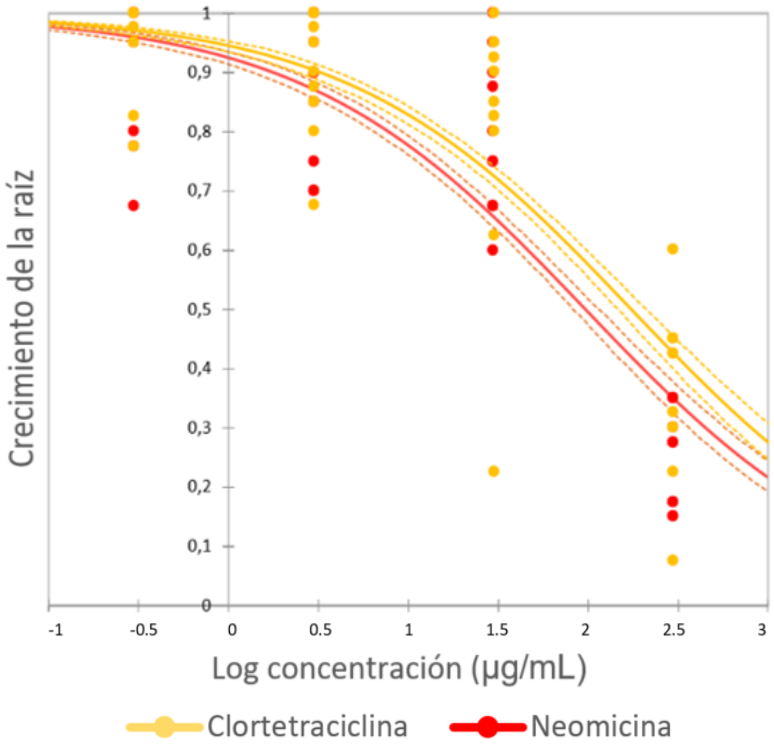
Finalmente, *E. fetida* ha demostrado la capacidad de acelerar la degradación de OTC en el suelo, contribuyendo a la biorremediación de este compuesto (Liu, Cao and Wang 2020, Yang et al. 2023a). Este fenómeno sugiere que este organismo no solo resiste la exposición a ciertos antibióticos, sino que también podría desempeñar un papel activo en la mitigación de su impacto ambiental, favoreciendo su degradación a metabolitos menos tóxicos.

En cuanto a los otros tres antibióticos evaluados en este estudio (NMC, FF y SDZ), la información disponible en la literatura científica es limitada. Los datos obtenidos en este trabajo constituyen, por tanto, el primer registro conocido de efectos ecotoxicológicos en *Eisenia fetida* para estos compuestos. En el caso específico de la SDZ, se ha documentado su absorción por vía digestiva en lombrices de tierra mediante el uso de ^{14}C-sulfadiazina, lo que demuestra la capacidad de estos organismos para incorporar antibióticos a través del tracto intestinal (Norr and Riepert 2007). Se ha sugerido que este mecanismo de absorción de la SDZ podría estar relacionado con la aparición de efectos subletales vinculados a alteraciones en la microbiota intestinal de *E. fetida,* afectando indirectamente la salud y funcionalidad de las lombrices, aunque sin llegar a provocar mortalidad (Kotzerke et al. 2010).

7.1.6 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre *A. cepa*

En la Figura 25 se presentan las curvas de dosis-respuesta de *A. cepa* tras 72 horas de exposición a CTC y NMC. Estas curvas reflejan una relación clara entre las concentraciones de los antibióticos y los efectos observados, lo que indica que ambos compuestos tienen un impacto significativo en esta especie vegetal en las condiciones evaluadas. Por otro lado, el resto de antibióticos probados mostraron valores de EC_{50} superiores a 300 µg/mL, lo que sugiere una menor fitotoxicidad. Todos los valores obtenidos pueden consultarse en la Tabla 14.

Figura 25: Toxicidad de los antibióticos sobre A. cepa tras 72h de exposición



Curva dosis-respuesta para A. cepa tras 72h de exposición a Clortetraciclina y Neomicina. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

Pese a que se ha informado que la CTC inhibe la elongación de raíces en otras especies vegetales como trigo, tabaco, lechuga y alfalfa (Kim et al. 2018, Kong et al. 2007, Wang et al. 2022c, Xie et al. 2010), hasta el momento la información disponible sobre su impacto en *A. cepa* sigue siendo escasa. Los estudios existentes sugieren que la exposición a la CTC no genera efectos genotóxicos en la germinación de sus semillas

(Magdaleno, Carusso and Moretton 2017). Sin embargo, se ha evidenciado que cultivos de esta especie pueden absorber CTC a través de sus raíces (Kumar et al. 2005), lo que indica que las plantas están expuestas de manera directa a este antibiótico cuando está presente en el suelo.

Las propiedades fisicoquímicas de la CTC (Tabla 9) pueden explicar su capacidad para penetrar en las células de *A. cepa* y alterar procesos fisiológicos fundamentales. Su moderada lipofilia favorece la interacción con las membranas celulares, mientras que su bajo peso molecular facilita el paso a través de las paredes celulares. Además, la habilidad de la CTC para formar enlaces de hidrógeno incrementa su afinidad con componentes estructurales como la pectina, promoviendo su movilidad a través de la envoltura celular vegetal. Una vez en el interior celular, es probable que la CTC interfiera con funciones metabólicas esenciales, ya sea mediante la unión directa a macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, o de forma indirecta a través de la generación de especies reactivas de oxígeno y la inducción de estrés oxidativo.

Por otra parte, el impacto de la NMC en *A. cepa* sí ha sido documentado en estudios previos. La literatura existente muestra alteraciones morfológicas significativas en las raíces de esta especie tras la exposición a concentraciones de NMC tan bajas como 3 µg/mL. Estas alteraciones incluyeron modificaciones en la forma y estructura radicular, lo que sugiere un efecto directo del antibiótico sobre los mecanismos de crecimiento de la raíz (Wilson 1950). De manera complementaria, investigaciones realizadas en otras especies vegetales, como *Arabidopsis thaliana*, han mostrado que la NMC también afecta la elongación radicular (Andreeva et al. 2010), lo que refuerza la hipótesis de que este antibiótico interfiere con procesos celulares conservados entre distintas especies vegetales, particularmente aquellos involucrados en la morfogénesis y el desarrollo del sistema radicular.

Se ha evidenciado que la NMC también posee la capacidad de atravesar las paredes celulares de las plantas, incluidas las de *A cepa*. Una de las características fisicoquímicas más relevantes de este antibiótico es, como se ha expuesto anteriormente, su naturaleza policatiónica, derivada de la presencia de múltiples grupos amino protonados a pH fisiológico. Este carácter catiónico favorece la formación de interacciones electrostáticas con componentes aniónicos de la pared celular vegetal, como la pectina y otros polisacáridos cargados negativamente. Tales interacciones

podrían facilitar el paso de la NMC a través de la pared celular y su posterior ingreso al interior celular.

Una vez dentro de las células de *A. cepa*, existen indicios de que la NMC actúa como un antagonista de la fosfolipasa-C, una enzima clave en múltiples vías de señalización celular (Reggiani and Laoreti 2000). La inhibición de esta enzima por parte de la NMC podría interrumpir estas rutas de señalización y alterar significativamente procesos fisiológicos esenciales, como la elongación de raíces y la capacidad de la planta para adaptarse a condiciones ambientales adversas.

Por otro lado, aunque los antibióticos OTC, FF y SDZ presentan mecanismos de acción igualmente eficaces contra bacterias, su toxicidad en plantas como *A. cepa* parece ser limitada bajo las condiciones experimentales evaluadas. No obstante, se han reportado algunos efectos específicos asociados con estos compuestos en diferentes estudios.

En el caso de las tetraciclinas, se ha observado que su presencia en el suelo puede interferir con las etapas iniciales del desarrollo vegetal, afectando negativamente la capacidad germinativa de las semillas. Sin embargo, el impacto genotóxico de estos compuestos parece ser escaso, lo que indica que las tetraciclinas podrían inducir efectos fisiológicos sin generar alteraciones directas en el material genético de las células vegetales (Cláudio Ernesto Taveira et al. 2018).

Respecto al FF, se ha demostrado que este antibiótico puede ser absorbido por las plantas, aunque su acumulación parece ser específica para ciertas especies y órganos vegetales. Estudios previos realizados bajo condiciones controladas con suelo enriquecido han encontrado que el FF puede ser absorbido por las raíces de zanahorias y las hojas de lechuga (Bártíková et al. 2015). Sin embargo, esta absorción es limitada y sugiere que el FF tiene una baja movilidad en el sistema vascular de las plantas, lo que podría explicar su reducida fitotoxicidad en *A. cepa*. Estos resultados también podrían estar relacionados con las propiedades fisicoquímicas del FF (Tabla 9), que podría dificultar su paso a través de las membranas celulares.

Finalmente, en el caso de la SDZ, su capacidad de absorción en plantas parece ser aún más restringida. Se ha documentado que este antibiótico muestra una absorción mínima o incluso nula en tejidos vegetales como las raíces de zanahoria y las hojas de

lechuga (Bártíková et al. 2015). Esta baja capacidad de absorción podría atribuirse a la naturaleza hidrofílica de la SDZ (Tabla 9) que causa una escasa afinidad por las membranas celulares vegetales, lo que limita significativamente su ingreso a los tejidos y, en consecuencia, reduce su potencial fitotóxico.

7.1.7 Ecotoxicidad de los antibióticos sobre las comunidades microbianas

7.1.7.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua

Las principales características físico-químicas de los ecosistemas acuático y terrestre de los que se obtuvieron las muestras utilizadas en este estudio se detallan en el Anexo 1.3. Esta información contextual es fundamental para la correcta interpretación de los resultados ecotoxicológicos, ya que permite considerar las condiciones ambientales específicas que pueden influir en la respuesta de los organismos superiores y comunidades microbianas evaluadas.

7.1.7.2 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas acuáticas

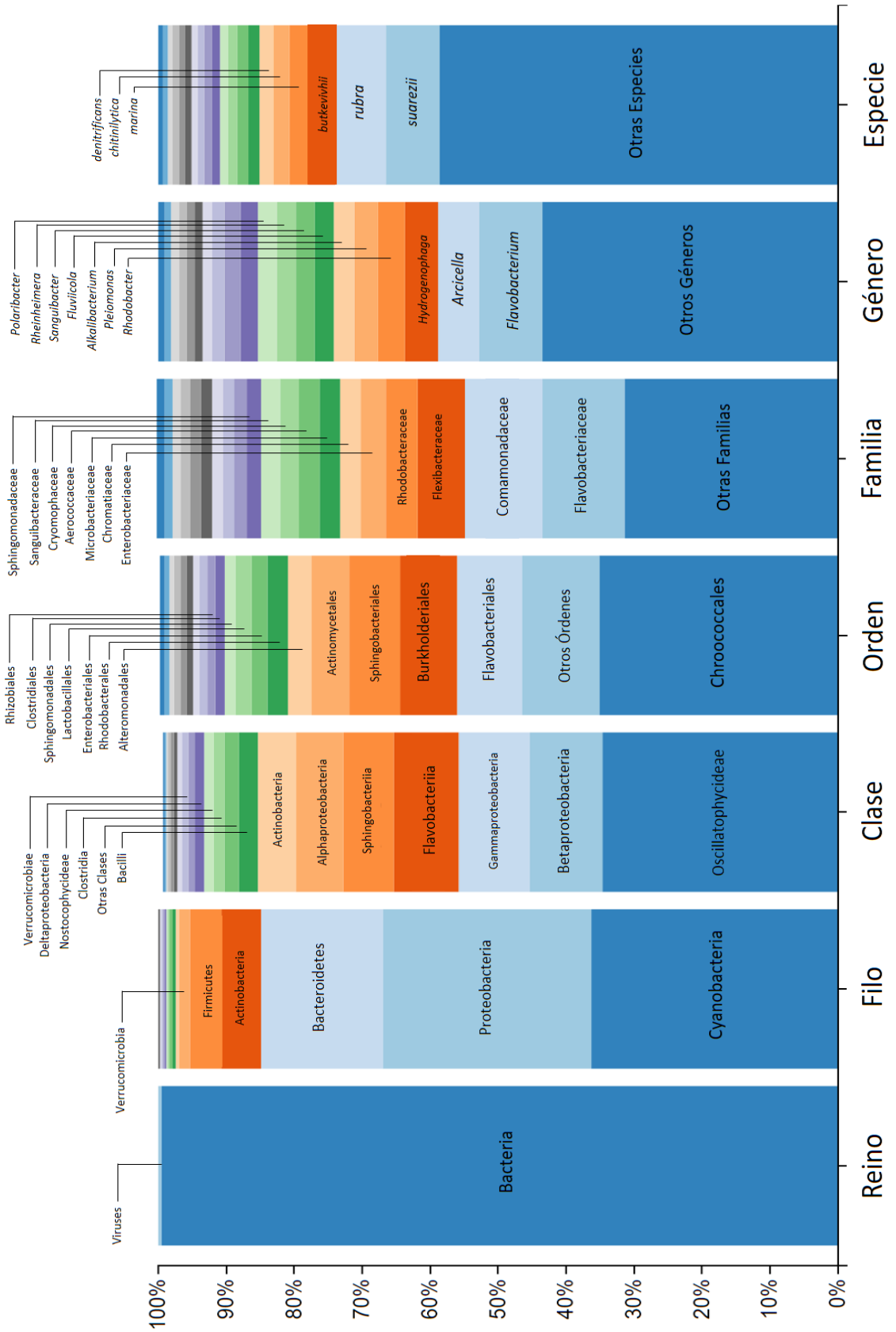
El análisis taxonómico de las bacterias presentes en las muestras de agua recolectadas del río Gállego se detalla en la Figura 26, donde se representan los taxones más prevalentes. Para garantizar la claridad en los datos, se han destacado únicamente los taxones que superan el 1% de abundancia relativa en los niveles de filo, clase y orden, y los que exceden el 2% en los niveles de familia, género y especie, debido a la mayor variabilidad observada en estos últimos niveles taxonómicos. En total, se obtuvieron 103496 lecturas durante el análisis.

En términos de identificación taxonómica, se logró identificar más del 95% de los microorganismos en los niveles superiores, correspondientes a reino, filo, clase y orden. Esto indica una alta resolución en la clasificación taxonómica inicial, lo que es consistente con la menor diversidad esperada en estos niveles jerárquicos. Sin embargo, al avanzar hacia niveles más específicos, como familia, género y especie, el porcentaje de identificación disminuyó de manera significativa: 61.88% a nivel de familia, 58.76% a nivel de género y únicamente 21.27% a nivel de especie. Esta reducción puede deberse

a la mayor complejidad taxonómica y a la limitada representación de secuencias de referencia disponibles en las bases de datos para estos niveles más específicos.

En la Figura 27 se muestra una visualización en forma de gráfico de pastel que destaca los principales filos bacterianos observados, junto con sus respectivos porcentajes. Los tres grupos predominantes fueron: *Cyanobacteria*, con un 36.1% del total de lecturas bacterianas; *Proteobacteria*, con un 30.3%; y *Bacteroidetes*, que representaron el 17.8%. Cabe señalar que el 15.8% de las lecturas no pudo ser clasificado en estos grupos, lo cual podría indicar la existencia de secuencias novedosas de microorganismos poco estudiados o a limitaciones en las bases de datos utilizadas para la asignación taxonómica.

Figura 26: Taxones más prevalentes de los microorganismos del río en cada nivel taxonómico.



Abundancia relativa de los microorganismos de la muestra de agua secuenciados genéticamente según sus clasificaciones taxonómicas. Elaboración propia.

Figura 27: Principales filos bacterianos en la muestra de río

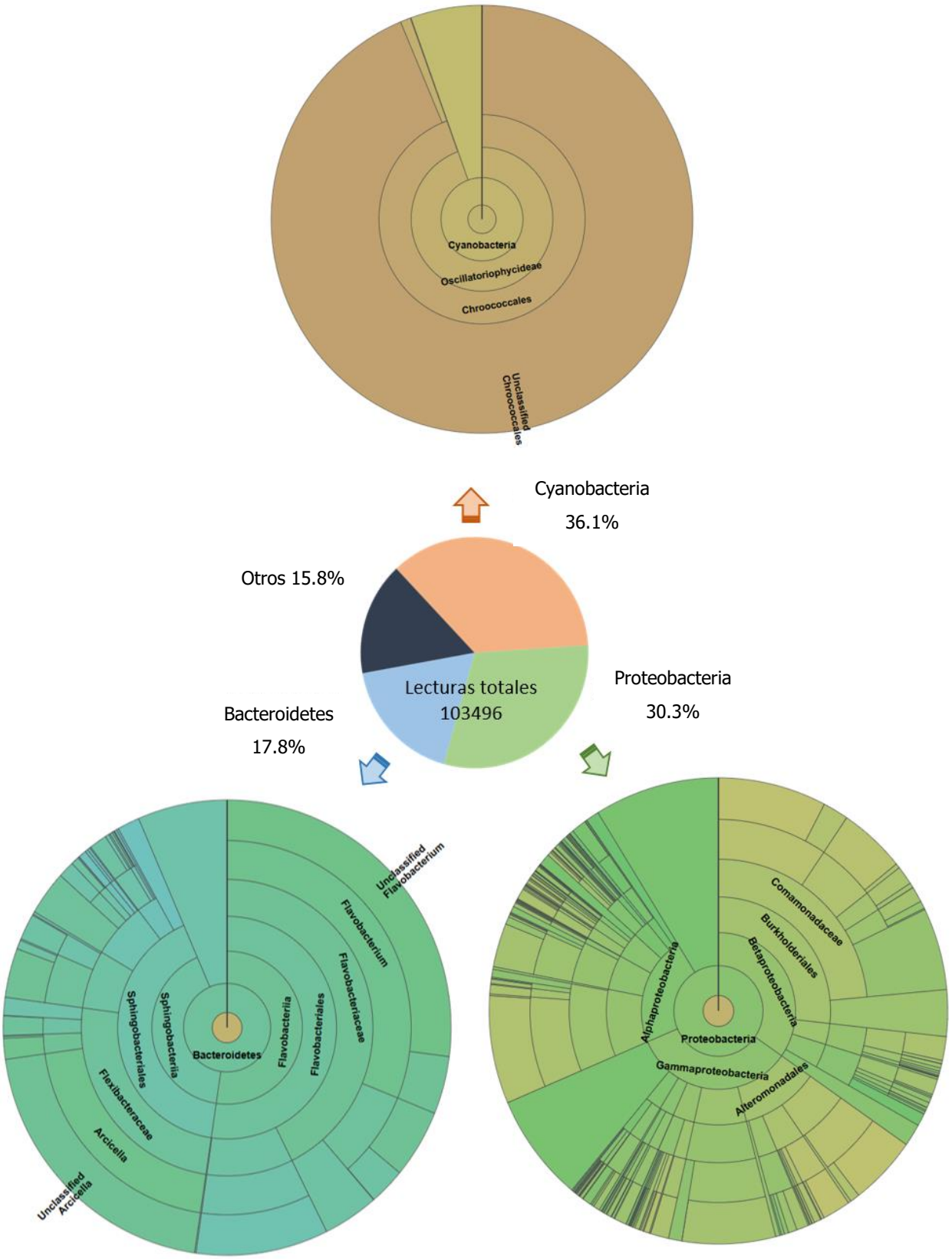


Ilustración de los filos más abundantes detectados en el suelo. Elaboración propia.

Las *Cyanobacteria* son bacterias fototróficas oxigénicas ampliamente distribuidas en ecosistemas acuáticos, particularmente en ambientes fluviales (Genuário, Vaz and Melo 2017, Sun et al. 2017). En el presente estudio, la mayoría de las cianobacterias detectadas pertenecieron a la clase *Oscillatoriophycidae* (94.5%), la cual se caracteriza por su capacidad de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica en aguas dulces. Dentro de esta clase, el orden *Chroococcales* fue el grupo más representativo, lo que concuerda con estudios previos que lo describen como un taxón dominante y ampliamente distribuido en biotopos de agua dulce (McGregor, Fabbro and Lobegeiger 2007).

Por su parte, las *Proteobacteria*, se distribuyeron principalmente entre las clases *Betaproteobacteria* (34.7%), *Gammaproteobacteria* (33.8%), y *Alphaproteobacteria* (22.6%). Este filo se caracteriza por su notable adaptabilidad y capacidad de respuesta rápida ante variaciones en la disponibilidad de nutrientes orgánicos (Madigan, Martinko and Parker 1997), lo que lo convierte en uno de los grupos bacterianos más dominantes en ecosistemas de agua dulce (Battistuzzi and Hedges 2009). Dentro de la clase *Betaproteobacteria*, el orden *Burkholderiales* fue el más abundante, representando el 77.1% de las lecturas correspondientes a esta clase. Este grupo destaca por su elevada diversidad metabólica y su implicación en la descomposición de compuestos orgánicos, así como en el reciclaje de nutrientes esenciales en medios acuáticos (Pérez Pantoja et al. 2011). En el caso de las *Gammaproteobacteria*, el orden *Alteromonadales* fue el más representativo, constituyendo el 33.2% de las lecturas asignadas a esta clase. Este orden es característico de comunidades microbianas fluviales (Xia et al. 2013, Narciso-da-Rocha and Manaia 2016) debido a su participación en la degradación de materia orgánica compleja (Pedler Sherwood et al. 2015). Asimismo, el orden *Pseudomonadales* mostró una presencia significativa, siendo ampliamente reconocidos por su capacidad para degradar compuestos fenólicos, contribuyendo activamente a los procesos de biorremediación en ambientes acuáticos contaminados (Zhang et al. 2012, Spain Jim and Gibson David 1991). Finalmente, entre las *Alphaproteobacteria*, el orden *Rhodobacterales* fue el más prevalente (41.9%). Este grupo incluye bacterias tanto fotosintéticas como heterótrofas, las cuales desempeñan un papel fundamental en el reciclaje del carbono y otros elementos clave para el equilibrio biogeoquímico de los ecosistemas de agua dulce (Kopejtka et al. 2017).

Para terminar, dentro del filo *Bacteroidetes*, las clases dominantes fueron *Flavobacteria*, que representaron el 52.3% de las lecturas, y *Sphingobacteriia*, que constituyeron el 41.2%, ambos compuestos principalmente por bacterias gram-

negativas que participan en la descomposición de materiales y polímeros complejos (Madigan et al. 1997).

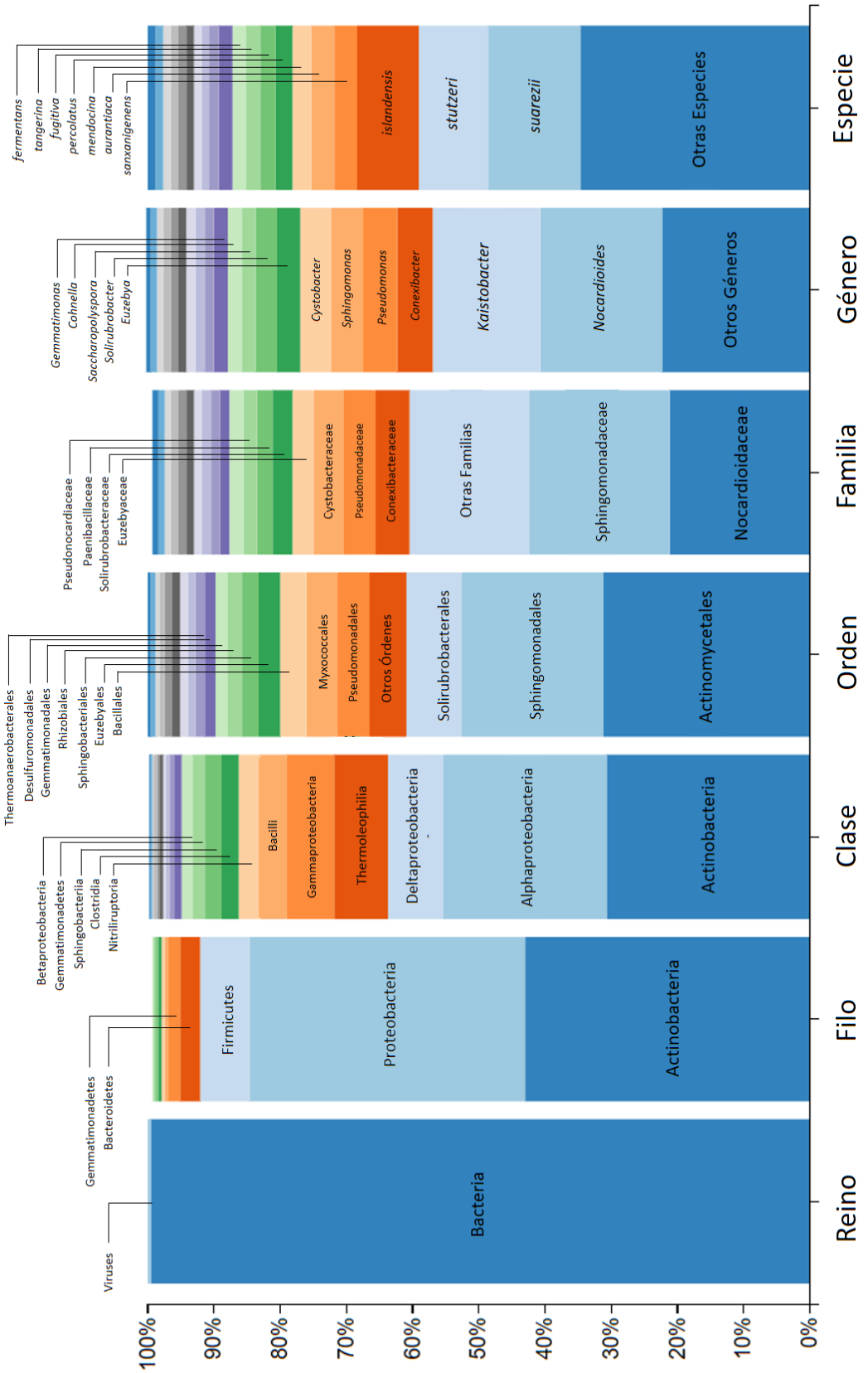
7.1.7.3 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas terrestres

El análisis taxonómico de las bacterias presentes en las muestras de suelo recolectadas del CITA (Zaragoza) se ilustra en la Figura 28, donde se destacan los taxones más predominantes. Para asegurar una interpretación clara de los datos, solo se han resaltado aquellos taxones cuya abundancia relativa supera el 1% en los niveles de filo, clase y orden, mientras que en los niveles de familia, género y especie se han considerado aquellos que exceden el 2%, debido a la mayor variabilidad observada en estas categorías. En total, el análisis generó 65193 lecturas.

En cuanto a la identificación taxonómica, se logró clasificar más del 90% de los microorganismos en los niveles superiores, que incluyen reino, filo, clase, orden y familia. Esto sugiere una alta precisión en la clasificación inicial. No obstante, a medida que se avanza hacia niveles más específicos, como género y especie, el porcentaje de identificación se reduce considerablemente: 88.25% en género y solo 25.88% en especie. Esta disminución puede atribuirse a la creciente complejidad taxonómica y a la limitada disponibilidad de secuencias de referencia en las bases de datos para estos niveles más detallados.

La Figura 29 muestra una gráfica que detalla la distribución de los principales filos bacterianos presentes en las muestras estudiadas. Mediante un gráfico de pastel, se representan los porcentajes relativos correspondientes a cada filo, lo que permite apreciar con claridad la composición de la comunidad microbiana. Los filos más abundantes fueron *Actinobacteria*, con un 41.9% de las lecturas, seguidos por *Proteobacteria* con un 40.5%, y *Firmicutes* con un 7.2%. Además, un 10.4% de las lecturas no pudo ser asignado a ningún filo conocido.

Figura 28: Taxones más prevalentes de los microorganismos del suelo en cada nivel taxonómico.



Abundancia relativa de los microorganismos de la muestra de suelo secuenciados genéticamente según sus clasificaciones taxonómicas. Elaboración propia.

Figura 29: Principales filos bacterianos en la muestra de suelo

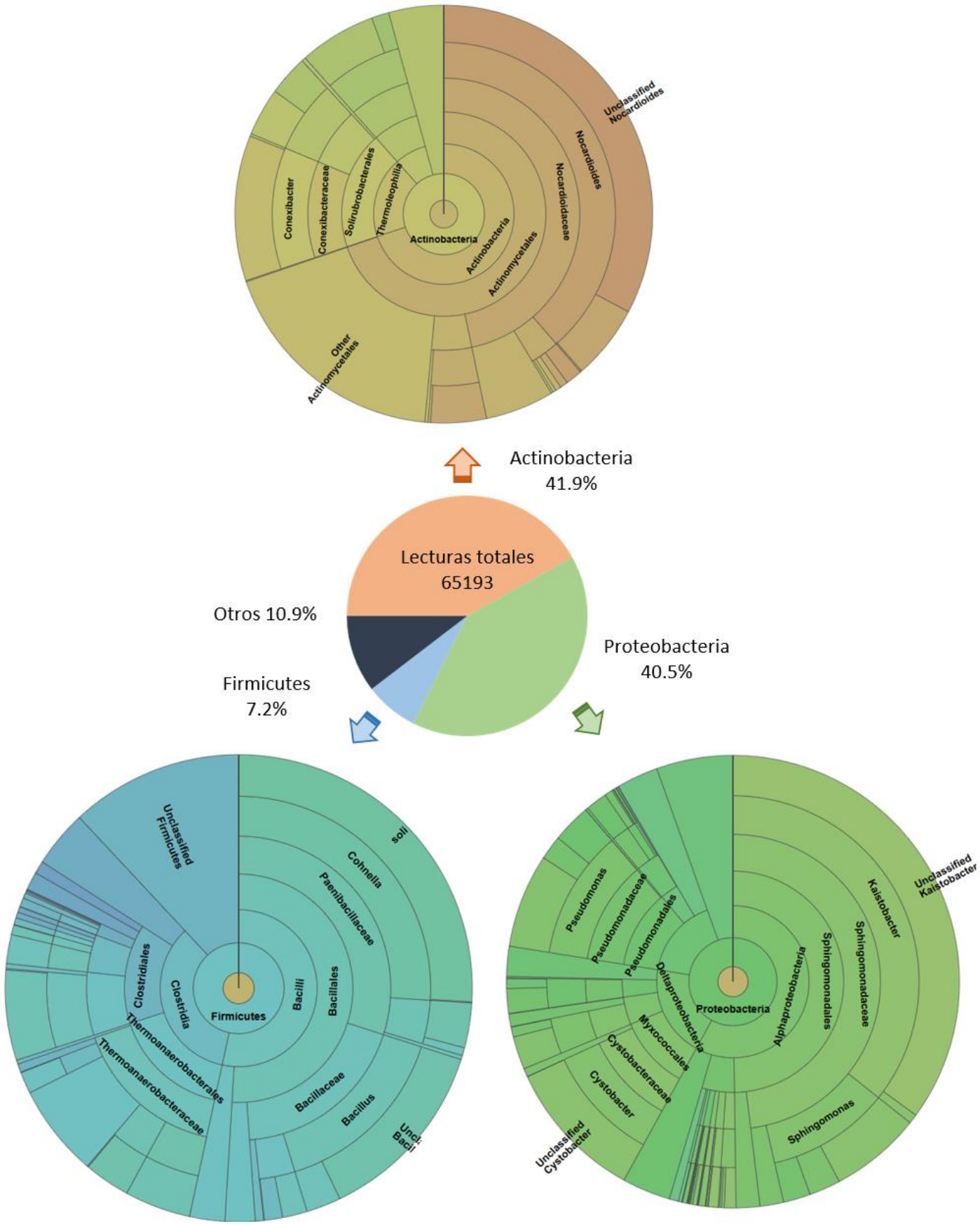


Ilustración de los filos más abundantes detectados en el suelo. Elaboración propia.

Esta distribución taxonómica es coherente con la diversidad bacteriana comúnmente observada en ecosistemas edáficos no perturbados, donde los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* suelen estar entre los más representativos. En estos ambientes, *Proteobacteria* tiende a ser especialmente abundante debido a su versatilidad metabólica y ecológica (Janssen Peter 2006, Spain, Krumholz and Elshahed 2009), *Actinobacteria* mantiene una presencia significativa por su papel en la degradación de materia orgánica y producción de antibióticos naturales (Spain et al. 2009), y *Firmicutes* se detecta frecuentemente, especialmente en suelos ricos en materia orgánica o bajo condiciones anaerobias (Zhang and Xu 2008, Hugenholtz, Goebel Brett and Pace Norman 1998, Wang et al. 2020a).

Dentro del filo *Actinobacteria*, predomina la clase *Actinobacteria* (69.8%), perteneciente casi en su totalidad al orden *Actinomycetales*, ampliamente distribuido en diversos tipos de suelo (Zhang and Xu 2008, Hugenholtz et al. 1998, Zhang et al. 2018b, Blain, Helgason and Germida 2017). En cuanto a las *Proteobacteria*, más de la mitad de las lecturas correspondieron a *Alphaproteobacteria* (58.0%), seguidas por *Deltaproteobacteria* (19.5%) y *Gammaproteobacteria* (17.0%). Casi todas las *Alphaproteobacteria* pertenecen al orden *Sphingomonadales* (85.8%), con una representación menor del orden *Rhizobiales* (8.2% del total de *Alphaproteobacteria*). Entre las *Deltaproteobacteria*, predominó el orden *Myxococcales* (54.9%), compuesto exclusivamente por miembros de la familia *Cystobacteraceae* y del género *Cystobacter*. En el caso de las *Gammaproteobacteria*, todos los representantes de la familia *Pseudomonadaceae* fueron identificados como *Pseudomonas*. Por último, entre los *Firmicutes*, las clases dominantes fueron *Bacilli* (53.4%) y *Clostridia* (34.8%).

7.1.7.4 Efecto de los antibióticos en las comunidades bacterianas acuáticas y terrestres: AWCD y CLPP

Los primeros gráficos en la Figura 30, Fig. 31, Fig. 32, Fig. 33 y Fig. 34 (a1) muestran el efecto de los cinco antibióticos empleados sobre los microorganismos del río a lo largo de los 6 días del ensayo, medido como AWCD en comparación con el control (línea negra). En todos los casos, se observa una clara relación dosis-respuesta, donde el aumento en la concentración de los antibióticos genera una inhibición progresiva en el crecimiento bacteriano.

A la menor concentración empleada en el estudio (0.1 µg/mL), todos los antibióticos, excepto NMC, provocaron una reducción apreciable en el crecimiento de bacterias del río. No obstante, estas disminuciones no fueron estadísticamente significativas en comparación con el control ($p > 0.05$), lo que sugiere que, a estas dosis, la comunidad microbiana conserva cierta capacidad de adaptación o resistencia. Sin embargo, a una concentración de 10 µg/mL, tanto OTC como FF mostraron efectos significativamente adversos en la población bacteriana ($p < 0.05$), con una disminución notable del crecimiento desde las 72 horas hasta el final del experimento.

En el caso de la concentración más elevada probada (100 µg/mL), todos los antibióticos ejercieron una inhibición marcada y estadísticamente significativa en comparación con el control ($p < 0.01$). Sin embargo, los efectos de OTC y CTC se hicieron evidentes de manera significativa solo a partir de las 72 y 96 horas, respectivamente ($p < 0.05$), lo que indica posibles diferencias en la cinética de acción de estos compuestos sobre la microbiota acuática.

Los valores de Lc_{50} se calcularon a las 168 horas, momento en el cual la cinética de crecimiento alcanzó la fase estacionaria (Tabla 14). En algunos casos, la inhibición del crecimiento fue tan pronunciada que solo se pudieron realizar estimaciones aproximadas, siendo la mayoría de los valores cercanos a cero. Esto indica que, a concentraciones elevadas, la exposición a estos antibióticos puede comprometer gravemente la viabilidad de la comunidad microbiana.

Los parámetros que describen la cinética de las curvas de AWCD para todas las concentraciones (*Cmax* y *r*) se encuentran detallados en la Tabla 15. Según los valores de *Cmax*, se puede establecer un orden de toxicidad de los antibióticos sobre las comunidades acuáticas, de mayor a menor: OTC > FF > SDZ ≈ CTC > NMC. A pesar del impacto en la abundancia microbiana, la tasa de crecimiento (*r*) no se vio afectada de manera considerable en comparación con el control, lo que sugiere que los antibióticos influyen más en la capacidad metabólica y en la composición de la comunidad microbiana que en su velocidad de crecimiento.

Las Fig. 30, Fig. 31, Fig. 32, Fig. 33 y Fig. 34 (a2–a4) representan el efecto de los cinco antibióticos en la capacidad metabólica de los microorganismos del río, medida mediante la utilización de los cinco grupos de sustratos de Biolog EcoPlates™. Los datos se expresan como la diferencia con respecto al control (cuyo valor se fija en 0 en el eje

x), permitiendo visualizar cómo varía la eficiencia en la metabolización de distintos compuestos en función de la concentración de los antibióticos.

Se observa una tendencia clara en la que el impacto en la actividad metabólica es dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración del antibiótico, menor es la capacidad de los microorganismos para metabolizar los distintos sustratos. En particular, OTC y FF fueron los antibióticos que causaron las mayores reducciones en la actividad metabólica bacteriana, con efectos detectables incluso a concentraciones tan bajas como 0.1 µg/mL. A esta concentración, la exposición a OTC redujo significativamente la metabolización de carbohidratos y aminoácidos ($p < 0.05$), mientras que FF afectó de manera notable la utilización de polímeros (ver asteriscos en Fig. 29 [a2–a4]).

Cuando la concentración de los antibióticos se elevó a 10 µg/mL, los efectos negativos fueron aún más evidentes. OTC provocó una inhibición significativa en la metabolización de todos los sustratos analizados ($p < 0.0001$), mientras que FF redujo de manera significativa el metabolismo de carbohidratos ($p < 0.0001$), ácidos carboxílicos y cetónicos ($p = 0.001$), así como polímeros ($p < 0.05$). Adicionalmente, OTC afectó de manera pronunciada la metabolización de polímeros, aminas y amidas ($p < 0.001$), además de los carbohidratos ($p = 0.001$), lo que sugiere un impacto más amplio en la funcionalidad microbiana en comparación con FF.

A la concentración más alta evaluada investigada (100 µg/mL), todos los antibióticos, incluyendo NMC y SDZ, causaron una inhibición drástica en la capacidad metabólica de los microorganismos acuáticos, con reducciones altamente significativas en prácticamente todos los sustratos ($p < 0.0001$). Estos resultados confirman que la exposición prolongada a altas concentraciones de antibióticos puede afectar severamente la diversidad funcional de la comunidad microbiana del río.

Por otro lado, las Fig. 30, Fig. 31, Fig. 32, Fig. 33 y Fig. 34 (b1) muestran el impacto de los cinco antibióticos en la actividad microbiana del suelo a lo largo de los siete días del ensayo, medido mediante la AWCD. Al igual que en los microorganismos acuáticos, se observó un claro efecto dosis-dependiente, en el cual la inhibición del crecimiento microbiano aumentó conforme se incrementó la concentración de los antibióticos. Todos los antibióticos generaron un impacto significativo en la cinética de crecimiento de las comunidades microbianas edáficas, afectando su desarrollo y actividad metabólica.

A concentraciones bajas (0.1 µg/mL), no se observaron diferencias significativas en el crecimiento microbiano edáfico en comparación con el control ($p > 0.05$), lo que sugiere que, a estas dosis, la comunidad microbiana del suelo pudo tolerar la presencia de los antibióticos sin una alteración marcada en su actividad. Sin embargo, a partir de 10 µg/mL, todos los compuestos estudiados, con excepción de FF, mostraron efectos adversos en el crecimiento bacteriano ($p < 0.05$), los cuales se hicieron evidentes a las 48 horas y persistieron hasta el final del experimento.

A la concentración más alta probada (100 µg/mL), la inhibición del crecimiento microbiano fue sustancial y altamente significativa en comparación con el control ($p < 0.01$) en todos los casos a partir de las 48 horas. La única excepción fue SDZ, cuyo efecto comenzó en el mismo punto temporal, pero con una menor intensidad ($p < 0.05$), lo que sugiere una menor toxicidad relativa en comparación con los otros antibióticos analizados.

Los valores de LC50 se calcularon al igual que en caso de las comunidades bacterianas acuáticas a las 168 horas, cuando la cinética de crecimiento alcanzó la fase estacionaria (Tabla 14). Los resultados indicaron que todos los antibióticos presentaron un LC50 inferior a 10 µg/mL, excepto FF y NMC, lo que evidencia que estos dos antibióticos son relativamente menos tóxicos para las comunidades microbianas del suelo en comparación con los otros compuestos evaluados.

Los parámetros *Cmax y r*, que describen la cinética de las curvas de AWCD, están disponibles en la Tabla 15. Según los valores de *Cmax*, la toxicidad relativa de los cinco antibióticos en las comunidades edáficas puede ordenarse de mayor a menor de la siguiente manera: CTC ≈ OTC > FF > SDZ > NMC.

En cuanto a la tasa de crecimiento (*r*), también se observó un impacto significativo. En particular, OTC fue el antibiótico que provocó la mayor reducción en este parámetro, con una disminución promedio del 16%. Le siguieron NMC y SDZ, con reducciones del 14% y 13%, respectivamente. CTC mostró un efecto menor (10%), mientras que FF no afectó este parámetro en absoluto, lo que sugiere que, aunque puede impactar el metabolismo microbiano, no altera significativamente la velocidad de crecimiento de la comunidad.

Por último, las Fig. 30, Fig. 31, Fig. 32, Fig. 33 y Fig. 34 (b2–b4) representan el efecto de los cinco antibióticos en la capacidad de los microorganismos del suelo para metabolizar distintos compuestos, evaluado mediante la utilización de los cinco grupos de sustratos de Biolog EcoPlates™. La comparación con el control (fijado en 0 en el eje x) permite visualizar la magnitud del impacto sobre la actividad metabólica.

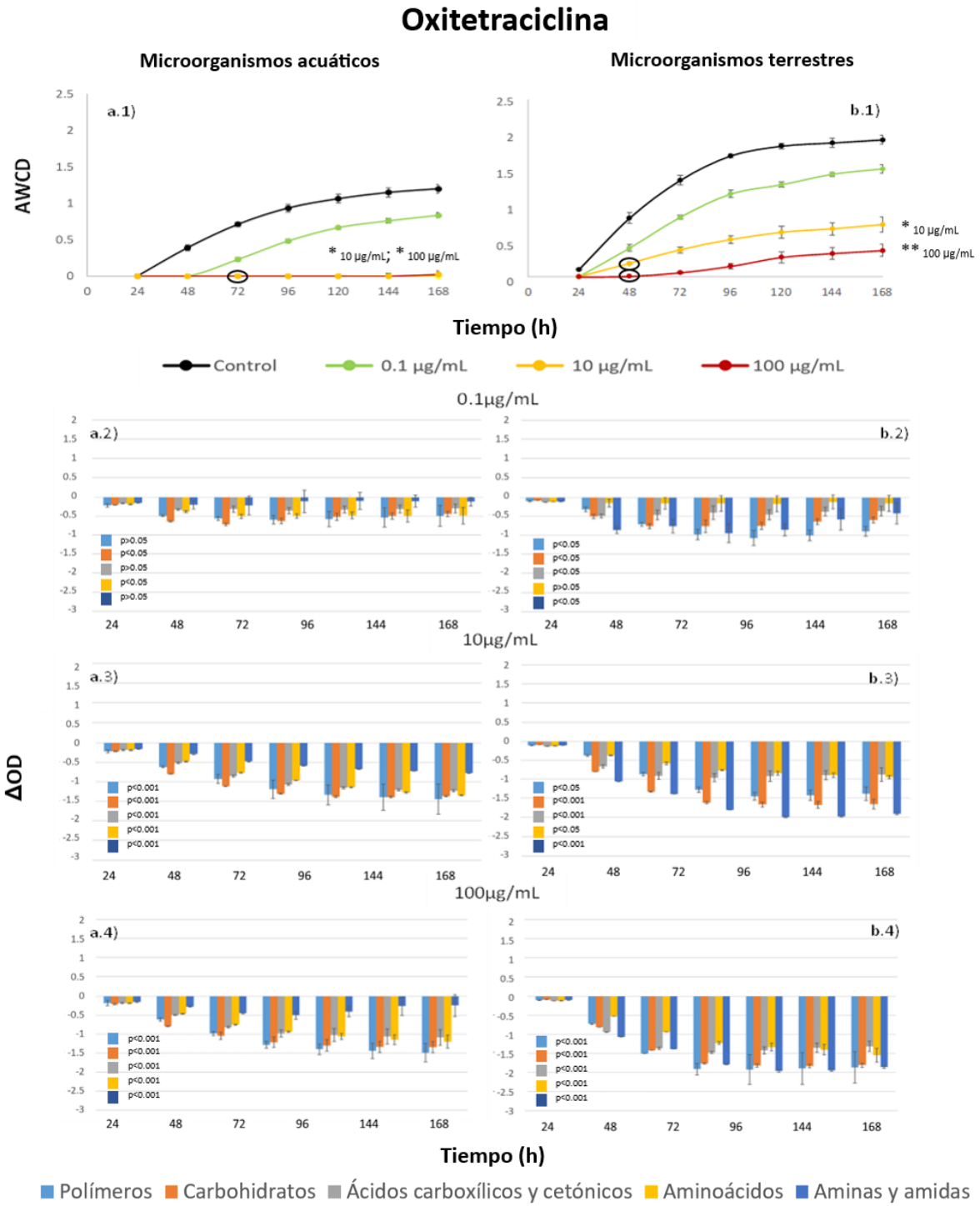
En todos los casos, se observó una disminución dosis-dependiente en la capacidad de los microorganismos para metabolizar los diferentes metabolitos. Además, esta reducción fue más pronunciada que la observada en los microorganismos acuáticos, indicando una mayor susceptibilidad de las comunidades microbianas del suelo a la exposición a los antibióticos. Notablemente, esta disminución ya era evidente a concentraciones tan bajas como 0.1 µg/mL.

A esta concentración, OTC mostró el mayor impacto en la actividad metabólica, afectando la metabolización de casi todos los compuestos analizados, con la excepción de los aminoácidos. Este patrón difiere del observado en los microorganismos del río, lo que sugiere que los efectos del antibiótico pueden variar según el tipo de ecosistema. Tanto OTC como FF afectaron significativamente la utilización de ciertos grupos de metabolitos, en particular aminas/amidas y ácidos carboxílicos y cetónicos ($p < 0.05$). No obstante, los grupos metabólicos impactados difirieron de aquellos afectados en los microorganismos acuáticos, lo que podría deberse a diferencias en la composición de la comunidad microbiana del suelo y su respuesta a los antibióticos.

A una concentración de 10 µg/mL, el impacto se intensificó, con una reducción significativa en la metabolización de casi todos los sustratos analizados ($p < 0.05$ y $p < 0.001$*), siendo este efecto menos pronunciado en el caso de NMC, lo que indica una menor toxicidad relativa de este compuesto en comparación con los demás antibióticos.

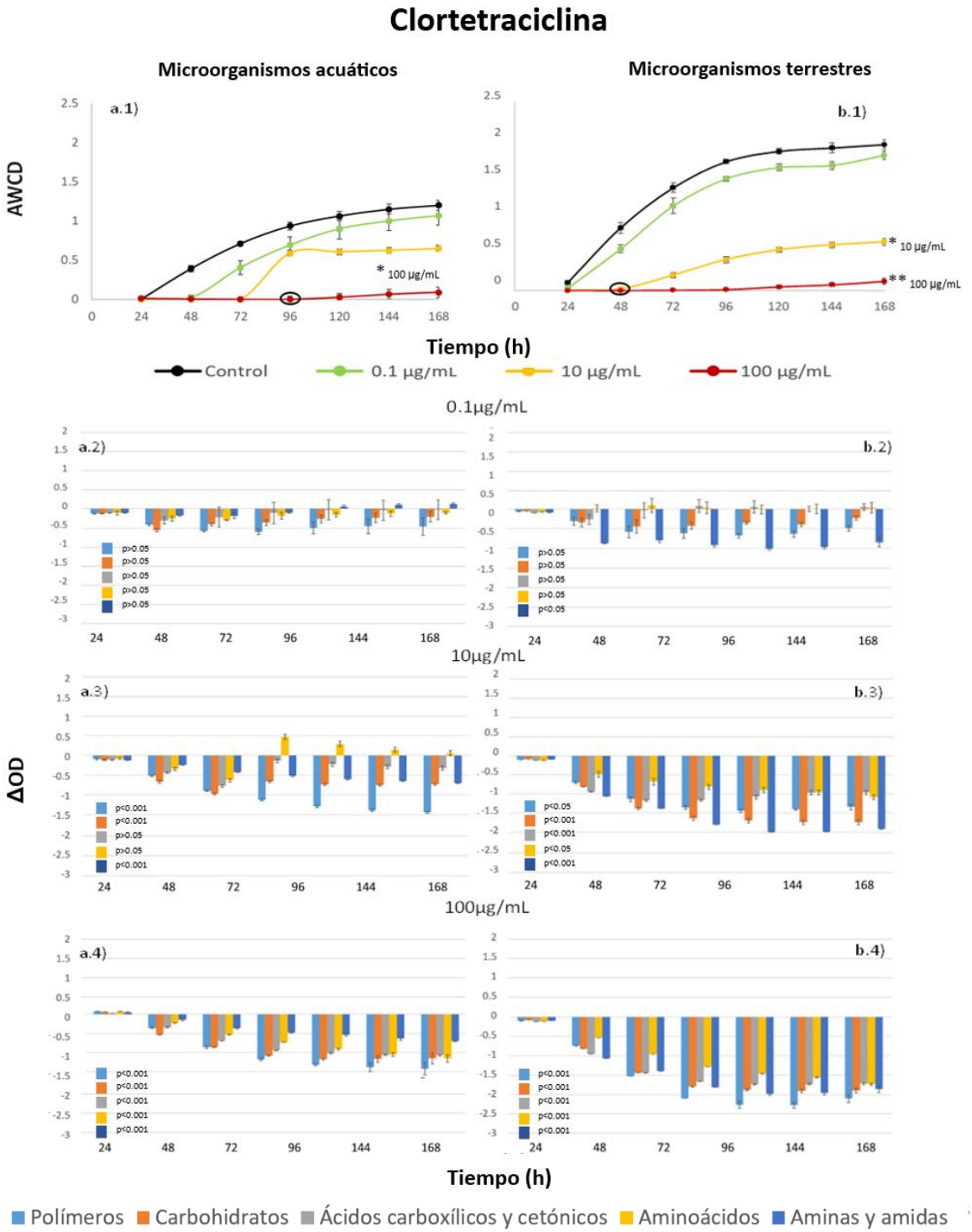
Finalmente, a la concentración más alta evaluada (100 µg/mL), todos los antibióticos provocaron una inhibición severa en la capacidad de los microorganismos del suelo para metabolizar los distintos compuestos. En prácticamente todos los casos, las reducciones en la actividad metabólica fueron altamente significativas ($p < 0.001$*), lo que sugiere un efecto adverso generalizado en la funcionalidad de la comunidad microbiana.

Figura 30: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Oxitetraciclina



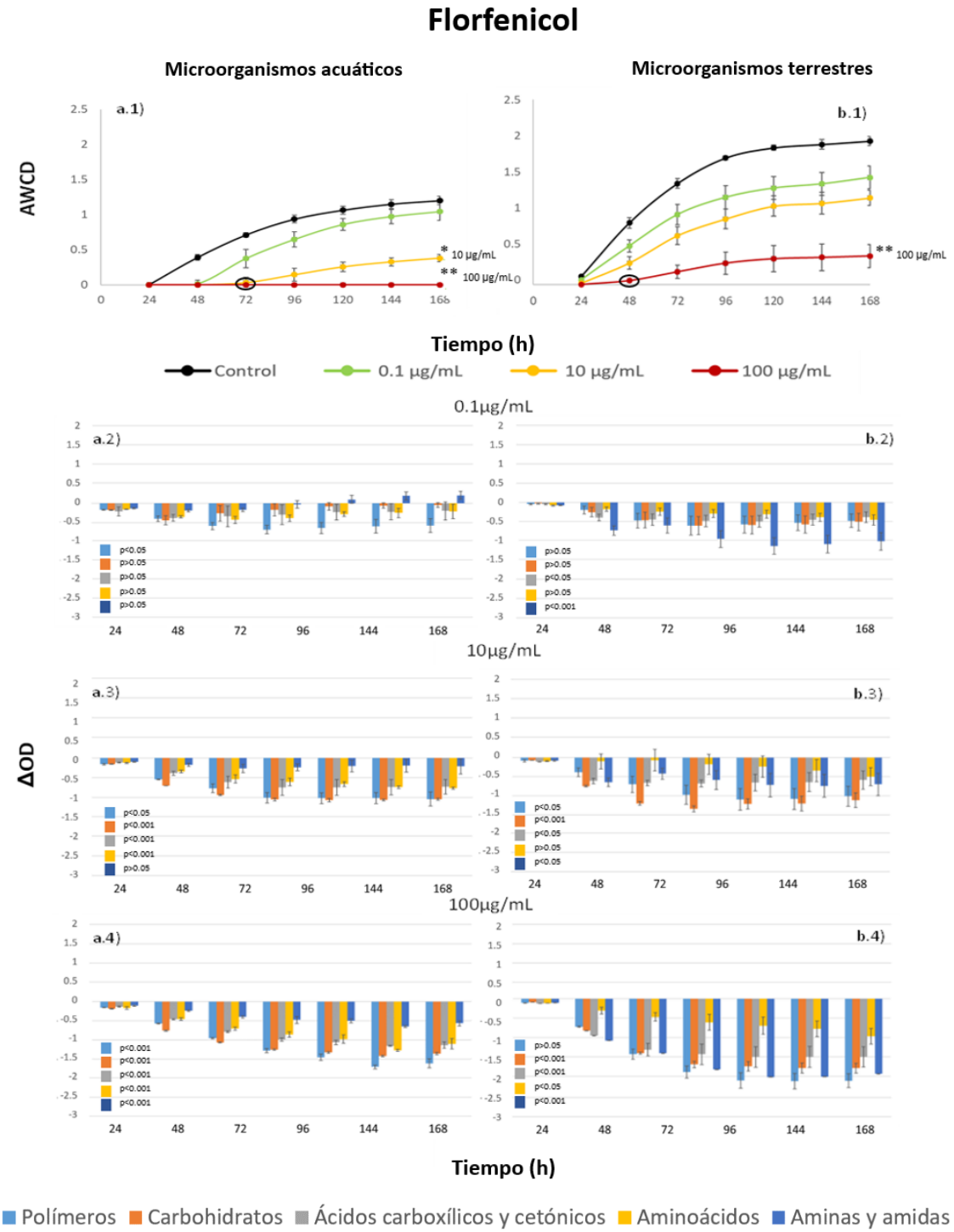
*Crecimiento microbiano cuantificado como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés) en placas Biolog EcoPlates, basado en una incubación de 168 horas de microorganismos de (a.1) río y (b.1) suelo expuestos a oxitetraciclina. El círculo que rodea un punto en las curvas de AWCD indica el momento en que las diferencias con respecto al control se vuelven significativas. Los asteriscos indican el grado de significancia: *p < 0.05 y **p < 0.01. Las barras representan la diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono de los microorganismos de (a.2 a a.4) río y (b.2 a b.4) suelo expuestos a diferentes concentraciones de oxitetraciclina con respecto al control (eje O), medido como densidad óptica (ΔOD). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas. Elaboración propia.*

Figura 31: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Clortetraciclina



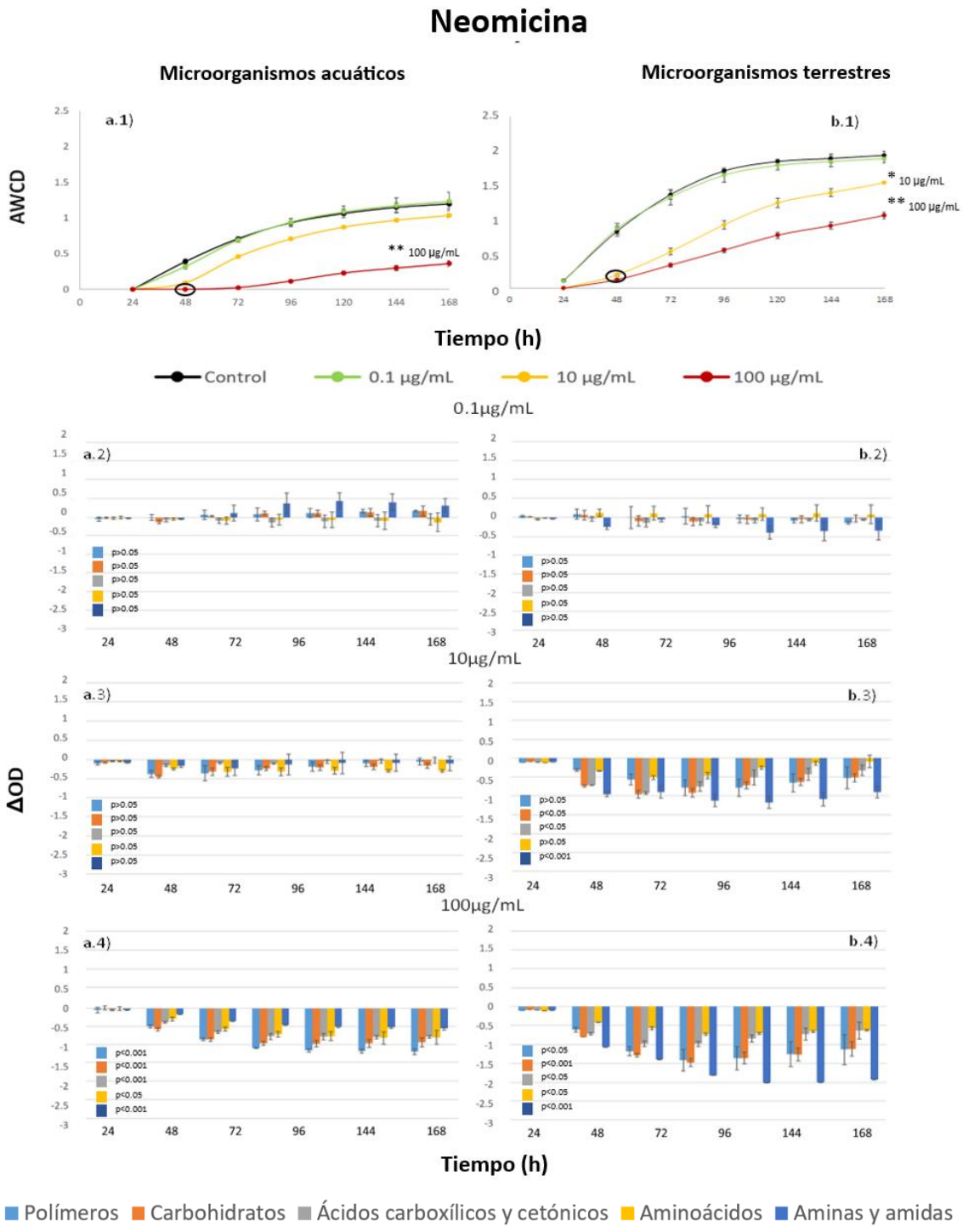
*Crecimiento microbiano cuantificado como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés) en placas Biolog EcoPlates, basado en una incubación de 168 horas de microorganismos de (a.1) río y (b.1) suelo expuestos a clortetraciclina. El círculo que rodea un punto en las curvas de AWCD indica el momento en que las diferencias con respecto al control se vuelven significativas. Los asteriscos indican el grado de significancia: *p < 0.05 y **p < 0.01. Las barras representan la diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono de los microorganismos de (a.2 a a.4) río y (b.2 a b.4) suelo expuestos a diferentes concentraciones de clortetraciclina con respecto al control (eje O), medido como densidad óptica (ΔOD). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas. Elaboración propia.*

Figura 32: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Florfenicol



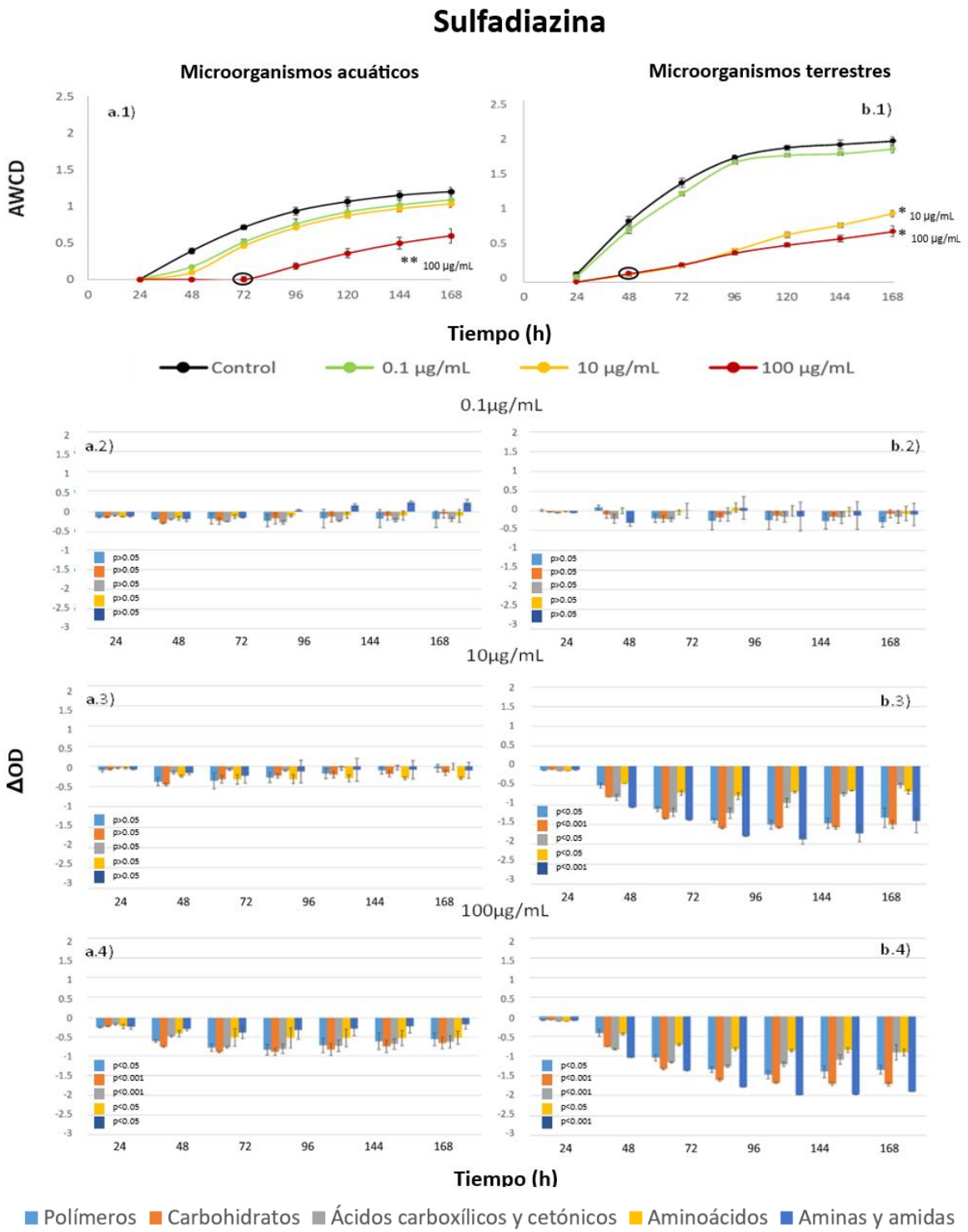
*Crecimiento microbiano cuantificado como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés) en placas Biolog EcoPlates, basado en una incubación de 168 horas de microorganismos de (a.1) río y (b.1) suelo expuestos a florfenicol. El círculo que rodea un punto en las curvas de AWCD indica el momento en que las diferencias con respecto al control se vuelven significativas. Los asteriscos indican el grado de significancia: *p < 0.05 y **p < 0.01. Las barras muestran la diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono de los microorganismos de (a.2 a a.4) río y (b.2 a b.4) suelo expuestos a diferentes concentraciones de florfenicol con respecto al control (eje O), medido como densidad óptica (ΔOD). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas. Elaboración propia.*

Figura 33: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Neomicina



*Crecimiento microbiano cuantificado como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés) en placas Biolog EcoPlates, basado en una incubación de 168 horas de microorganismos de (a.1) río y (b.1) suelo expuestos a neomicina. El círculo que rodea un punto en las curvas de AWCD indica el momento en que las diferencias con respecto al control se vuelven significativas. Los asteriscos indican el grado de significancia: *p < 0.05 y **p < 0.01. Las barras representan la diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono de los microorganismos de (a.2 a a.4) río y (b.2 a b.4) suelo expuestos a diferentes concentraciones de neomicina con respecto al control (eje O), medido como densidad óptica (ΔOD). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas. Elaboración propia.*

Figura 34: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Sulfadiazina



*Crecimiento microbiano cuantificado como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés) en placas Biolog EcoPlates, basado en una incubación de 168 horas de microorganismos de (a.1) río y (b.1) suelo expuestos a sulfadiazina. El círculo que rodea un punto en las curvas de AWCD indica el momento en que las diferencias con respecto al control se vuelven significativas. Los asteriscos señalan el grado de significancia: *p < 0.05 y **p < 0.01. Las barras representan la diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono de los microorganismos de (a.2 a a.4) río y (b.2 a b.4) suelo expuestos a diferentes concentraciones de sulfadiazina en comparación con el control (eje O), medido como densidad óptica (ΔOD). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas. Elaboración propia.*

Tabla 15: Parámetros cinéticos (Cmax y r) de las curvas de AWCD de microorganismos de río y suelo expuestos a los antibióticos evaluados.

	Comunidades microbianas acuáticas					Comunidades microbianas terrestres			
	Control	**CTC 0.1 (µg/mL)**	**CTC 10 (µg/mL)**	**CTC 100 (µg/mL)**		**Control**	**CTC 0.1 (µg/mL)**	**CTC 10 (µg/mL)**	**CTC 100 (µg/mL)**
Cmax	1.15	1.03	0.62	0.07		1.89	1.71	0.63	0.17
r	0.05	0.06	0.49	0.08		0.06	0.06	0.06	0.05
	Control	**OTC 0.1 (µg/mL)**	**OTC 10 (µg/mL)**	**OTC 100 (µg/mL)**		**Control**	**OTC 0.1 (µg/mL)**	**OTC 10 (µg/mL)**	**OTC 100 (µg/mL)**
Cmax	1.15	0.81	-	-		1.89	1.47	0.71	0.38
r	0.05	0.06	-	-		0.06	0.05	0.05	0.06
	Control	**FF 0.1 (µg/mL)**	**FF 10 (µg/mL)**	**FF 100 (µg/mL)**		**Control**	**FF 0.1 (µg/mL)**	**FF 10 (µg/mL)**	**FF 100 (µg/mL)**
Cmax	1.15	1.01	0.33	-		1.89	1.38	1.13	0.38
r	0.05	0.06	0.07	-		0.06	0.06	0.05	0.06
	Control	**SDZ 0.1 (µg/mL)**	**SDZ 10 (µg/mL)**	**SDZ 100 (µg/mL)**		**Control**	**SDZ 0.1 (µg/mL)**	**SDZ 10 (µg/mL)**	**SDZ 100 (µg/mL)**
Cmax	1.15	1.05	0.60	-		1.89	1.79	0.99	0.70
r	0.05	0.05	0.06	-		0.06	0.06	0.04	0.04
	Control	**NMC 0.1 (µg/mL)**	**NMC 10 (µg/mL)**	**NMC 100 (µg/mL)**		**Control**	**NMC 0.1 (µg/mL)**	**NMC 10 (µg/mL)**	**NMC 100 (µg/mL)**
Cmax	1.15	1.19	0.99	0.35		1.89	1.84	1.52	1.09
r	0.05	0.05	0.06	0.06		0.06	0.06	0.05	0.04

Elaboración propia.

El impacto de los antibióticos en las comunidades microbianas no se limita a la reducción del crecimiento bacteriano, sino que también provoca una serie de cambios complejos en la estructura y el metabolismo de la comunidad.

El amplio espectro de acción antibacteriana de los antibióticos estudiados es la causa de una elevada actividad antimicrobiana, lo que explica el fuerte impacto detectado en las comunidades microbianas, tanto acuáticas como terrestres, al interferir con procesos esenciales para la supervivencia y proliferación bacteriana. Su efecto puede atribuirse a la presencia de dianas específicas en las células bacterianas, como la inhibición de la síntesis de proteínas o de la replicación del ADN, lo que altera el equilibrio de las comunidades microbianas y provoca modificaciones en su estructura y funcionalidad (Martinez 2009).

Por otra parte, las variaciones en la sensibilidad de las comunidades microbianas detectadas a los distintos antibióticos pueden estar influenciadas por múltiples factores. Entre ellos, la diversidad taxonómica presente en las muestras de suelo y agua (Fig. 26, 27, 28 y 29) desempeña un papel crucial, ya que las comunidades con una mayor riqueza de especies pueden presentar una mayor heterogeneidad en su respuesta a la exposición antibiótica. Las bacterias gram-negativas, por ejemplo, poseen una membrana externa que puede actuar como una barrera de permeabilidad selectiva, reduciendo la eficacia de ciertos antibióticos, mientras que las gram-positivas, con una pared celular más gruesa pero menos compleja, pueden ser más susceptibles a determinados compuestos. Asimismo, las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los antibióticos determinan su solubilidad, estabilidad y capacidad de difusión en el medio, afectando su biodisponibilidad y el grado de impacto en las poblaciones bacterianas.

Como consecuencia de estas diferencias estructurales y bioquímicas, la exposición a los antibióticos tiende a reducir las poblaciones bacterianas más sensibles, mientras que aquellas con mecanismos de resistencia o tolerancia pueden proliferar y derivar en una disminución de la diversidad microbiana, incluso si la biomasa total se mantiene relativamente estable (Suga, Ogo and Suzuki 2013). Esta reducción de la biodiversidad puede comprometer funciones clave, como la degradación de materia orgánica, el reciclaje de nutrientes y la resiliencia del microbioma frente a otros estresores ambientales.

Además, no se pueden descartar las estrategias de resistencia bacteriana como un factor clave en la respuesta de las comunidades microbianas a la exposición a estos antibióticos. La presencia de estos mecanismos en poblaciones bacterianas expuestas a estos compuestos no solo afecta la composición y funcionalidad de la comunidad microbiana, sino que también representa un riesgo ecológico significativo al favorecer la diseminación de genes de resistencia en el ambiente.

Los antibióticos analizados en este estudio ejercen efectos variables sobre las comunidades microbianas fluviales y edáficas, dependiendo de su concentración y de las características del ecosistema. Mientras que OTC y FF mostraron un impacto más pronunciado en las bacterias del agua, SDZ y CTC afectaron principalmente las comunidades del suelo. Hasta la fecha, esta es la primera vez que se estudian los efectos de estos antibióticos en el perfil metabólico de las bacterias, aunque existen evidencias previas sobre el impacto de algunos de estos antibióticos en la composición de las comunidades bacterianas.

Se ha documentado que la OTC genera modificaciones en la estructura de las comunidades microbianas en ecosistemas acuáticos, reduciendo en algunos casos la diversidad microbiana (Harrabi et al. 2019, Hu et al. 2002). En particular, se ha observado que la exposición a OTC puede favorecer un incremento en la abundancia de *Proteobacteria* (30.3% de nuestras muestras), mientras que reduce la presencia de *Bacteroidetes* (17.8%), afectando especialmente al género *Flavobacterium* (Zhou et al. 2020). La alteración en la proporción de estos filos bacterianos podría estar relacionada con las diferencias en la susceptibilidad de sus miembros a OTC. *Proteobacteria*, al incluir una amplia gama de especies con mecanismos de resistencia, podrían proliferar en presencia del antibiótico, mientras que Bacteroidetes, más sensibles a la exposición, verían reducida su población.

Investigaciones previas han sugerido que FF puede reducir la presencia de bacterias involucradas en el proceso de nitrificación (Gao et al. 2018). (Zhang et al. 2022b) reportaron que a bajas concentraciones (0.1 µg/mL), FF tenía un impacto mínimo sobre la estructura de la comunidad; sin embargo, a concentraciones elevadas (100 µg/mL), el efecto era drástico. Los resultados de este ensayo coinciden con sus hallazgos, mostrando una disminución significativa en la capacidad metabólica de los microorganismos expuestos a FF ($p < 0.0001$ en todos los metabolitos analizados). Esto

sugiere que FF puede alterar el equilibrio funcional de las comunidades acuáticas, afectando su capacidad para procesar diferentes compuestos orgánicos.

En el caso de la SDZ, los efectos detectados sobre el crecimiento y la capacidad metabólica de las bacterias del río fueron menores en comparación con los de otros antibióticos. Pese a ser menos pronunciados, los efectos podrían deberse a la reducción de poblaciones bacterianas sensibles como *Proteobacteria* (30.3% de nuestras muestras) y *Comamonadaceae* (7.1%) (Bai et al. 2019).

El impacto de las tetraciclinas en las comunidades microbianas del suelo ha sido estudiado en mayor profundidad, evidenciando efectos significativos en la actividad metabólica y la composición bacteriana. (Kong et al. 2006) reportaron que la aplicación de OTC en bacterias aisladas del suelo provoca una reducción significativa en la utilización de sustratos y en AWCD, lo que indica una disminución en la capacidad metabólica de las comunidades microbianas expuestas. Otros estudios han evaluado el impacto de OTC y CTC aplicando los antibióticos directamente al suelo, lo que dificulta la comparación de resultados debido a variaciones en la composición del suelo, el contenido de materia orgánica y la disponibilidad de los antibióticos en la matriz del suelo (Liu et al. 2015, Liu et al. 2012, Ma et al. 2016, Solís et al. 2011).

En general, los resultados de AWCD han mostrado que el impacto de OTC y CTC es más pronunciado en experimentos con bacterias aisladas que en estudios realizados directamente sobre el suelo. Esto se debe a que la exposición de los microorganismos en el sustrato del suelo es más limitada por la adsorción y degradación del antibiótico en la matriz. El efecto también es menor cuando la exposición se produce por aplicación de estiércol contaminado con estos antibióticos (Chroňáková, Kyselková and Elhottová 2021, Fang et al. 2014a).

Estudios previos también han demostrado que la resistencia a estas tetraciclinas varía según el filo bacteriano: *Proteobacteria* y *Actinobacteria* parecen mostrar una mayor tolerancia a la exposición a CTC, mientras que *Firmicute*s son más sensibles (Fang et al. 2014a). Por otro lado, (Han et al. 2019) observaron que, en suelos fertilizados expuestos a CTC, la abundancia relativa de *Actinobacteria* y *Firmicutes* aumentaba significativamente, mientras que la de *Proteobacteria* disminuía. Este cambio en la composición de la comunidad microbiana podría estar relacionado con diferencias en la capacidad de los distintos filos para degradar o resistir la acción de las tetraciclinas, así

como con la posible alteración de interacciones microbianas clave en el ecosistema terrestre.

Además, varios estudios han evaluado los efectos de OTC y CTC en aspectos concretos de las bacterias del suelo, como la actividad metabólica de bacterias oxidaditas de amonio del suelo (Liu et al. 2020) o el análisis de biomasa y estructura de ácidos grasos de fosfolípidos (Chen, Zhu and Zhang 2023), mostrando que concentraciones elevadas de antibióticos (200 mg/kg) provocan una disminución significativa en la actividad de enzimas clave mientras que concentraciones bajas o moderadas (0.1 y 1 mg/kg) de estos antibióticos no generan efectos adversos considerables.

Al igual que en las comunidades bacterianas acuáticas, la presencia de FF en los suelos genera alteraciones en el ciclo del nitrógeno, afectando a bacterias clave involucradas en este proceso. En particular, se ha observado que la exposición a FF puede reducir la actividad de microorganismos responsables del ciclo del nitrógeno, lo que impacta la disponibilidad de compuestos nitrogenados esenciales para la fertilidad del suelo y el equilibrio ecológico del ecosistema (Zhou et al. 2021). Por otro lado, la respuesta de las comunidades bacterianas a la exposición a FF varía según el grupo taxonómico. Algunas investigaciones han evidenciado que Proteobacteria parece ser más resistente a este antibiótico en comparación con otros filos bacterianos (Wang et al. 2021). Los cambios que se producen en estructura general de la comunidad microbiana acuática tras la exposición a FF si ha sido analizado previamente apuntando a un descenso en el abundancia de las *Actinobacteria* (40% de nuestra muestra) y Firmicutes (7%) (Uddin et al. 2019).

Por su parte, la SDZ ha sido identificada como un antibiótico con alta afectación sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas edáficas. En general, se ha documentado que la exposición a este antibiótico a dosis elevadas (50mg/Kg) puede provocar cambios significativos en la estructura de la comunidad microbiana del suelo (Santás-Miguel et al. 2020, Xu et al. 2016), generando un aumento en la abundancia relativa de *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Clostridium*, mientras que reduce la presencia de Actinobacteria y Pseudomonas (Ding et al. 2014, Lin et al. 2016, Qiu et al. 2021). Estos cambios en la estructura de la comunidad bacteriana podrían explicar las alteraciones en los patrones metabólicos detectados en nuestro estudio, particularmente en la utilización de carbohidratos. Investigaciones previas han encontrado que la exposición a SDZ en suelos parece favorecer el metabolismo de carbohidratos, probablemente debido a la

proliferación de bacterias que pueden degradar estos compuestos con mayor eficiencia en presencia del antibiótico mientras que la metabolización de aminoácidos se ve inhibida tras la exposición, lo que sugiere que las bacterias afectadas desempeñaban un papel clave en el procesamiento de estos compuestos nitrogenados (Qiu et al. 2021).

Además, se ha demostrado que la presencia de SDZ en el suelo afecta a la actividad respiratoria microbiana (Fang et al. 2014b) y reduce la tasa potencial de nitrificación y la diversidad de microorganismos con capacidad para oxidar amonio (Hammesfahr et al. 2011, Hou et al. 2023, Li et al. 2022, Liao et al. 2019, Radl et al. 2015). Estos artículos estudian el comportamiento de la SDZ aplicándola directamente al suelo mediante aspersión (Hammesfahr et al. 2011, Liao et al. 2019, Qiu et al. 2021) o a través de estiércol contaminado con este antibiótico (Ding et al. 2014, Li et al. 2022, Radl et al. 2015, Xu et al. 2016), existiendo tan solo un único estudio que emplea bacterias aisladas al igual que en esta investigación (Zielezny et al. 2006), sin embargo, los ensayos fueron realizados con la prueba de difusión en agar y por tanto los resultados obtenidos no son comparables.

Finalmente, en cuanto a NMC, los cambios detectados en la actividad y el perfil metabólico de los microorganismos del suelo en esta investigación coinciden con los hallazgos previos, donde se documenta que la presencia de NMC en el suelo genera una reducción significativa de la actividad enzimática relacionada con la eliminación de microorganismos clave, esenciales para los procesos fundamentales en el suelo (Benassi-Borba et al. 2021). Por otro lado, también se ha encontrado que bacterias del género *Pseudomonas* desaparece en suelos tratados con NMC, mientras que *Gammaproteobacteria* logran sobrevivir, lo que transforma los ecosistemas (Zhang et al. 2017).

7.2 BLOQUE II: Actividad antimicrobiana de los productos naturales individuales

Tras la evaluación de la toxicidad ambiental de antibióticos sintéticos desarrollada en el bloque I, este segundo bloque de resultados se centra en el análisis de la actividad antimicrobiana de compuestos naturales, con el fin de valorar su potencial como alternativas terapéuticas frente a los antibióticos convencionales. De esta manera, se da cumplimiento al segundo objetivo específico planteado en esta tesis doctoral:

> **OBJETIVO II**: "Identificar compuestos naturales con actividad antimicrobiana frente a microorganismos de relevancia clínica"

Los resultados correspondientes a la actividad antimicrobiana del TER han sido publicados en el siguiente artículo, lo que evidencia la relevancia científica del estudio y su contribución al conocimiento actual en este ámbito:

Pino-Otín, M., Valenzuela, A., Gan, C., Ferrando, N., Langa, E., Ballestero, D. Terpineol Enhances Antibiotic Effectiveness and Reduces Resistance in Clinically Relevant Bacteria. HELIYON (Q1, Factor de Impacto: 2.9)

En la primera parte de este artículo se presentan los resultados obtenidos al evaluar la actividad antimicrobiana del TER de forma individual frente a un conjunto de cepas bacterianas de relevancia clínica. Esta etapa experimental permitió establecer el espectro de acción del TER, así como determinar su eficacia relativa en condiciones controladas, generando información fundamental sobre su potencial uso como agente antimicrobiano alternativo. La segunda parte del artículo se centra en el estudio de las interacciones del TER en combinación con distintos antibióticos sintéticos, frente a las mismas cepas bacterianas, cuyos resultados serán desarrollados en profundidad en el Bloque IV.

Este artículo puede consultarse íntegramente en el **anexo 2.1**

7.2.1 Resumen

Este segundo bloque de resultados se centra en la evaluación sistemática del potencial antimicrobiano de una selección de compuestos bioactivos de origen natural, frente a diversas cepas bacterianas representativas de interés sanitario y ambiental. La investigación parte de la creciente necesidad de explorar alternativas viables al uso de antibióticos sintéticos, dada la expansión de cepas resistentes y la pérdida progresiva de eficacia de muchos antimicrobianos convencionales. En este contexto, los productos naturales, especialmente aquellos derivados de fuentes vegetales o microbianas, han cobrado un renovado interés como posibles agentes antimicrobianos selectivos, con mecanismos de acción diferentes o complementarios a los de los fármacos actualmente en uso.

El diseño experimental se orientó a evaluar el potencial antimicrobiano de estos compuestos bajo condiciones controladas y estandarizadas, con el fin de obtener datos comparables y reproducibles entre sí. Para ello se aplicaron metodologías clásicas de microbiología experimental con el objetivo de caracterizar cuantitativamente la capacidad inhibitoria de cada producto frente a cepas bacterianas gram-positivas y gram-negativas de relevancia clínica y ambiental.

Aunque los ensayos fueron realizados en un conjunto amplio de sustancias naturales, el estudio se centró con mayor profundidad en dos compuestos específicos que mostraron perfiles de actividad destacables: la HQ y el TER. Ambos compuestos presentaron una eficacia inhibitoria significativa, lo que los posiciona como candidatos especialmente prometedores en el contexto de estrategias alternativas o complementarias al uso de antibióticos convencionales.

La caracterización detallada de su actividad permitió no solo cuantificar los niveles de inhibición bacteriana, sino también identificar patrones diferenciales de sensibilidad entre los microorganismos, lo que sugiere posibles mecanismos de acción específicos. Esta información resulta clave para orientar futuras investigaciones, tanto en el ámbito farmacológico como en aplicaciones biotecnológicas, y abre nuevas líneas para el desarrollo racional de formulaciones más efectivas y selectivas basadas en compuestos bioactivos naturales.

De forma complementaria, se evaluó la actividad antimicrobiana de varios antibióticos sintéticos bajo las mismas condiciones experimentales aplicadas a los compuestos naturales. Esta estrategia permitió establecer un marco de referencia estandarizado que facilita la comparación directa entre ambos grupos de sustancias. La inclusión de antibióticos clínicamente establecidos no solo aporta validez metodológica, sino que también permite poner en contexto el desempeño de los productos naturales, comparando su eficacia relativa frente a principios activos con uso terapéutico reconocido.

El valor añadido de este bloque radica en primer lugar en la ampliación del conocimiento existente sobre sustancias naturales con actividad antimicrobiana, muchas de las cuales han sido escasamente estudiadas en este contexto, ampliando así el repertorio de agentes bioactivos potenciales en la lucha contra bacterias patógenas. Además, los resultados generados en este bloque sirven como base experimental esencial para el desarrollo de los siguientes bloques de la tesis, en los cuales se abordará de forma integrada la combinación de antibióticos y productos naturales, evaluando no solo su efecto antimicrobiano conjunto, sino también sus implicaciones ecotoxicológicas.

La información generada en este bloque resulta particularmente valiosa para el diseño de futuras investigaciones orientadas al estudio de interacciones funcionales entre compuestos naturales y antibióticos sintéticos, con especial énfasis en la identificación de posibles sinergias terapéuticas. Este enfoque, que ha cobrado un creciente protagonismo en los últimos años, representa una de las estrategias más prometedoras en la lucha contra la resistencia antimicrobiana, al permitir no solo potenciar la eficacia de los antibióticos convencionales mediante el uso de coadyuvantes naturales, sino también reducir las dosis necesarias, mitigar efectos adversos y ralentizar la aparición de cepas resistentes.

7.2.2 Información específica sobre material y métodos

La experimentación presentada en este bloque se estructura en tres fases diferenciadas.

En primer lugar, puesto que algunos productos naturales eran pocos solubles en agua, se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad de los distintos disolventes disponibles sobre las bacterias seleccionadas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2.1, con el fin de seleccionar aquellos que pudieran emplearse sin interferir en los ensayos posteriores.

A continuación, se analizó la solubilidad de los productos naturales en agua y en los solventes seleccionados conforme al procedimiento indicado en el apartado 6.2.2, lo cual permitió determinar las condiciones adecuadas para su disolución.

Por último, se evaluó la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano tanto de los productos naturales como de los antibióticos, de acuerdo con los métodos recogidos en los apartados 6.2.3 y 6.2.4, respectivamente.

7.2.3 Ensayo de toxicidad de los disolventes

Varios de los productos naturales utilizados presentaban baja solubilidad en agua, lo que hizo necesario evaluar diferentes disolventes orgánicos para garantizar su adecuada disolución. Este proceso implicó analizar la posible interferencia de los disolventes en los ensayos biológicos, especialmente en relación con su potencial toxicidad sobre las cepas bacterianas empleadas, con el fin de asegurar que los resultados obtenidos reflejaran exclusivamente la actividad de los compuestos evaluados. La siguiente tabla 16 muestra las concentraciones máximas de cada disolvente en las cuales se observó un crecimiento bacteriano similar al control para cada una de las cepas bacterianas seleccionadas según el apartado 5.3:

Tabla 16: Concentraciones máximas de cada disolvente toreable por cada cepa bacteriana

Cepa bacteriana	DMSO (% v/v)	Polisorbato 20 (%v/v)	Polisorbato 80 (%v/v)	Etanol (%v/v)
B. subtilis	2.5	1.25	1.25	1.25
E. faecalis	2.5	1.25	1.25	1.25
L. monocytogenes	2.5	1.25	1.25	1.25
S. aureus	2.5	1.25	1.25	1.25
S. agalactiae	2.5	1.25	1.25	1.25
A. baumannii	2.5	<0.31	1.25	<0.31
E. coli	2.5	1.25	1.25	1.25
K. aerogenes	2.5	<0.31	1.25	1.25
K. pneumoniae	2.5	1.25	1.25	<0.31
P. aerogenes	2.5	<0.31	1.25	1.25
P. mirabilis	<0.31	<0.31	<0.31	<0.31
P. aeruginosa	2.5	1.25	<0.31	<0.31
S. Typhimurium	2.5	<0.31	1.25	<0.31
S. marcescens	2.5	<0.31	<0.31	<0.31
C. albicans	2.5	1.25	1.25	1.25

Elaboración propia.

En general, se ha observado que la mayoría de las cepas bacterianas toleraron concentraciones de hasta 2.5% de DMSO, 1.25% de polisorbato 20, 1.25% de polisorbato 80 y 1.25% de etanol sin afectar significativamente su crecimiento en comparación con el control. Todas las cepas gram-positivas presentaron buena tolerancia a los disolventes evaluados mientras que alguna de las bacterias gram-

negativas experimentaron un descenso en su crecimiento al exponerlas a bajas concentraciones de los disolventes.

El DMSO fue el disolvente mejor tolerado, ya que todas las cepas estudiadas, excepto *P. mirabilis*, mostraron crecimiento normal hasta una concentración del 2.5%.

Los polisorbatos 20 y 80 mostraron un patrón de tolerancia similar en la mayoría de las cepas bacterianas, con una concentración máxima permitida de 1.25%. Sin embargo, algunas especies como *A. baumannii*, *K. aerogenes*, *P. aerogenes*, *P. mirabilis*, S. Typhimurium y *S. marcescens* presentaron una baja tolerancia al polisorbato 20; mientras que *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *S. marcescens* vieron afectado su crecimiento en presencia de Polisorbato 80 a bajas concentraciones.

Por su parte, la tolerancia al etanol varió entre las cepas empleadas, afectando al crecimiento de *P. aeruginosa*, *P. mirabilis, A. baumannii,* S. Typhimurium, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*.

Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado que concentraciones moderadas de DMSO y polisorbatos no suelen tener efectos bacteriostáticos o bactericidas en diversas especies microbianas (Tabla 12)

7.2.4 Ensayo de solubilidad de los productos naturales en los disolventes orgánicos

El ensayo de solubilidad se realizó en condiciones controladas y reproducibles. Para cada antibiótico se pesó una cantidad definida de sólido en vasos de precipitados y se evaluó su disolución en los distintos disolventes seleccionados. El disolvente se añadió de forma gradual hasta alcanzar la completa solubilidad del compuesto, registrando en cada caso el volumen total empleado. Cuando fue necesario, se recurrió al uso de ultrasonido para favorecer la dispersión. Una vez obtenida la solución clara, las muestras se dejaron reposar durante al menos 48 horas con el objetivo de descartar fenómenos de precipitación o la formación de películas superficiales. Todas las pruebas se efectuaron a temperatura ambiente, en un rango aproximado de 22 a 25 °C. Las concentraciones máximas de solubilidad para cada uno de los productos naturales en agua y en los diferentes disolventes orgánicos empleados en el estudio se presentan en la tabla 17.

Tabla 17: Solubilidad máxima de los productos naturales en cada uno de los disolventes

Producto natural	Solubilidad máxima (µg/mL)				
	Agua	DMSO 2.5 %	Polisorbato 20 1.25 %	Polisorbato 80 1.25 %	Etanol 1.25 %
Ácido ferúlico	>4000	-	-	-	-
Citronellal	<100	>2000	>4000	>4000	-
Hidroquinona	>4000	-	-	-	-
Lisozima	>4000	-	-	-	-
Mentol	<100	>2000	>4000	>4000	-
Naringenina	<100	<100	<100	<100	<100
Papaína	>4000	-	-	-	-
Quercetina	<100	<100	<100	<100	<100
Terpienol	<100	>2000	>4000	>4000	-

-: Ensayo no realizado por solubilidad adecuada en disolventes menos tóxicos

Elaboración propia.

Los resultados obtenidos proporcionan información valiosa para la selección del disolvente óptimo en función del tipo de compuesto natural a disolver.

El AFE, la HQ, la LS y la PAP mostraron una excelente solubilidad en agua (>4000 µg/mL), lo que sugiere una alta afinidad por este medio polar. Por ello, no se requiere el uso de disolventes orgánicos adicionales, lo que puede ser beneficioso en formulaciones que buscan minimizar la toxicidad y maximizar la compatibilidad biológica. Esto es consistente con la presencia de grupos funcionales hidrofílicos en su estructura, como grupos hidroxilo y carbonilos, que favorecen su interacción con moléculas de agua mediante enlaces de hidrógeno.

Por otro lado, compuestos como el CAL, el MTL, la NAR, la QTC y el TER presentaron una solubilidad muy limitada en agua (<100 µg/mL), lo que indica una marcada naturaleza hidrofóbica. Estos compuestos, mayormente terpénicos o

flavonoides, poseen estructuras que carecen de suficientes grupos polares para formar interacciones fuertes con el agua, lo que restringe su disolución en este medio.

En este estudio, el CAL, el MTL y el TER mostraron una solubilidad significativamente mayor en DMSO (>2000 µg/mL), lo que confirma su utilidad para disolver compuestos de naturaleza lipofílica. En contraste, la NAR y la QTC presentaron una solubilidad baja en DMSO (<100 µg/mL), lo que sugiere que su limitada solubilidad no solo es un problema en agua, sino también en solventes menos polares.

De manera similar, el CAL, el MTL y el TER también presentaron una excelente solubilidad en ambos polisorbatos (>4000 µg/mL), lo que sugiere que estos disolventes son altamente efectivos para solubilizar compuestos terpénicos. De nuevo, la NAR y la QTC mostraron una solubilidad baja en ambos tensioactivos (<100 µg/mL) causado posiblemente por una pobre interacción con las micelas formadas por los polisorbatos.

Finalmente, el etanol tampoco fue útil para disolver ni la NAR ni la QTC, lo que podría indicar que su baja solubilidad se debe a factores estructurales específicos, como una fuerte tendencia a la agregación o a la cristalización o una pobre interacción con las micelas formadas por los polisorbatos.

7.2.5 Concentración mínima inhibitoria de los productos naturales

La tabla 18 muestra las MICs y las MBCs obtenidas de los productos naturales empleados en el estudio frente a las bacterias seleccionadas y el hongo *C. albicans*. Se incluyeron únicamente aquellos compuestos que lograron disolverse en los disolventes adecuados para su evaluación frente a los microorganismos, no pudiéndose realizar los ensayos sobre NAR ni QCT.

Posteriormente, se presenta una cuantificación del número de MIC obtenidas para cada compuesto (tabla 19) y los resultados obtenidos de la realización de una búsqueda bibliográfica de las MICs que presentan los dos productos con mayor actividad antimicrobiana (tabla 20).

Tabla 18: MIC y MBC de los productos naturales solubles sobre las cepas bacterianas del estudio

Producto natural	Disolvente		*B. subtilis*	*E. faecalis*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*S. agalactiae*	*A. baumannii*	*E. coli*	*K. aerogenes*	*K. pneumoniae*	*P. aerogenes*	*P. mirabilis*	*P. aeruginosa*	*S.* Typhimurium	*S. marcescens*	*C. albicans*
Ácido ferúlico	Agua	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
		MBC/MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronellal	DMSO	MIC (mg/mL)	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	*	>1	>1	>1	**0.5**
		MBC (mg/mL)	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	*	>1	>1	>1	**>1**
		MBC/MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**>1**
	P20	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	*	>2	*	>2	*	*	>2	*	*	**0.5**
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	*	>2	*	>2	*	*	>2	*	*	**>1**
		MBC/MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**>1**
	P-80	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	**1**	>2	>2	>2	>2	>2	>2	*	*	>2	*	>2
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	**1**	>2	>2	>2	>2	>2	>2	*	*	>2	*	>2
		MBC/MIC	-	-	-	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidroquinona	Agua	MIC (mg/mL)	**2**	>2	**0.5**	**1**	>2	**1**	>2	**2**	**2**	**1**	**2**	>2	**2**	**1**	>2
		MBC (mg/mL)	**2**	>2	**1**	**2**	>2	**1**	>2	**2**	**2**	**1**	**2**	>2	**2**	**1**	>2
		MBC/MIC	**1**	-	**>1**	**>1**	-	**1**	-	**1**	**1**	**1**	**1**	-	**1**	**1**	-
Lisozima	Agua	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	**2**	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	**0.5**
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	**>2**	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	**>2**
		MBC/MIC	-	-	-	-	**>1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**>1**

Producto natural	Disolvente		*B. subtilis*	*E. faecalis*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*S. agalactiae*	*A. baumannii*	*E. coli*	*K. aerogenes*	*K. pneumoniae*	*P. aerogenes*	*P. mirabilis*	*P. aeruginosa*	*S.* Typhimurium	*S. marcescens*	*C. albicans*
Mentol	DMSO	MIC (mg/mL)	>1	>1	>1	**0.5**	>1	>1	>1	>1	>1	>1	*	>1	>1	**1**	**0.5**
		MBC (mg/mL)	>1	>1	>1	**0.5**	>1	>1	>1	>1	>1	>1	*	>1	>1	**1**	**>1**
		MBC/MIC	-	-	-	**1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**1**	**>1**
	P20	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	**0.5**	>2	*	>2	*	**1**	*	*	>2	*	*	**0.5**
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	**0.5**	>2	*	>2	*	**1**	*	*	>2	*	*	**>1**
		MBC/MIC	-	-	-	**1**	-	-	-	-	**1**	-	-	-	-	-	**>1**
	P-80	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	**1**	>2	*	*	>2	*	**0.5**
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	**1**	>2	*	*	>2	*	**>2**
		MBC/MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	**1**	-	-	-	-	-	**>1**
Papaína	Agua	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
		MBC/MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpineol	DMSO	MIC (mg/mL)	**0.5**	>1	>1	>1	**0.5**	**0.25**	>1	**1**	**0.5**	**0.5**	*	>1	**1**	**0.5**	**0.25**
		MBC (mg/mL)	**0.5**	>1	>1	>1	**1**	**0.25**	>1	**1**	**>1**	**0.5**	*	>1	**1**	**0.5**	**0.25**
		MBC/MIC	**1**	-	-	-	**>1**	**1**	-	**1**	**>1**	**1**	-	-	**1**	**1**	**1**
	P20	MIC (mg/mL)	**0.5**	**2**	**2**	**0.5**	**0.5**	*	**2**	*	**0.5**	*	*	>2	*	*	**0.25**
		MBC (mg/mL)	**1**	**2**	**2**	**0.5**	**1**	*	**2**	*	**1**	*	*	>2	*	*	**1**
		MBC/MIC	**>1**	**1**	**1**	**1**	**>1**	-	**1**	-	**>1**	-	-	-	-	-	**>1**
	P-80	MIC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	**2**	>2	**1**	**1**	**1**	**1**	*	*	**0.5**	*	**1**
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	>2	**>2**	>2	**1**	**1**	**1**	**1**	*	*	**0.5**	*	**1**
		MBC/MIC	-	-	-	-	**>1**	-	**1**	**1**	**1**	**1**	-	-	**1**	-	**1**

Elaboración propia.

Los resultados muestran que la elección del disolvente influyó en la actividad de varios compuestos. En algunos casos, como el TER y el CAL, los valores de MIC fueron menores en T20 y en T80 en comparación con DMSO, lo que sugiere que la formulación micelar favoreció su dispersión y acción antimicrobiana.

En general, se observó una mayor susceptibilidad de las bacterias gram-positivas (*B. subtilis, S. aureus, L. monocytogenes, S. agalactiae*) en comparación con las gram-negativas (*A. baumannii, E. coli, K. aerogenes, K. pneumoniae, P. aerogenes, P. aeruginosa, S. Typhimurium, S. marcescens*). Esto es consistente con la estructura de la envoltura celular de cada grupo: la pared de las bacterias gram-negativas poseen una membrana externa que actúa como barrera contra la entrada de moléculas hidrofóbicas, lo que podría explicar su menor susceptibilidad a algunos de los compuestos evaluados.

El AFE y la PAP no mostraron actividad inhibidora del crecimiento ni bactericida contra ninguna de las cepas analizadas, ya que las MIC y MBC fueron superiores a 2 mg/mL en todos los casos Este resultado sugiere que, a pesar de sus conocidas propiedades antioxidantes y sus potenciales actividades en otros contextos biológicos, sus efectos antimicrobianos en las concentraciones evaluadas son mínimos.

El CAL mostró una ligera actividad contra *C. albicans*, con una MIC de 0.5 mg/mL, lo que sugiere un potencial efecto antifúngico. Sin embargo, su actividad contra las bacterias fue limitada, con MIC superiores a 1 mg/mL en la mayoría de las cepas. Se observó que la elección del disolvente influyó en su actividad, ya que cuando se evaluó en T80, presentó inhibición contra *Staphylococcus aureus* con una MIC de 1 mg/mL, mientras que en DMSO no mostró este efecto.

La LS presentó actividad contra *S. agalactiae* y *C. albicans*, con MIC de 2 mg/mL y 0.5 mg/mL, respectivamente. Sin embargo, no se observó actividad significativa contra la mayoría de las bacterias gram-negativas ni contra otras bacterias gram-positivas.

El MTL mostró una MIC de 0.5 mg/mL contra *S. aureus* y *C. albicans*, lo que indica una actividad antimicrobiana significativa. Además, la relación MBC/MIC en todas las bacterias donde presentaba actividad fue de 1, lo que sugiere un efecto bactericida directo.

La HQ fue uno de los compuestos más activos, mostrando MIC entre 0.5 y 2 mg/mL contra varias cepas. Se observó actividad especialmente contra *L.*

monocytogenes (MIC = 0.5 mg/mL), *S. aureus* (1 mg/mL), *A. baumannii* (1 mg/mL), *K. aerogenes* (2 mg/mL), *K. pneumoniae* (2 mg/mL), *P. aerogenes* (1 mg/mL), S. Typhimurium (2 mg/mL) y *S. marcescens* (2 mg/mL). El hecho de que la relación MBC/MIC fuera ≤2 en la mayoría de los casos sugiere un posible efecto bactericida más que bacteriostático.

El TER fue otro de los compuestos con mejor actividad antimicrobiana detectada en este estudio. El valor de MIC más bajo detectado fue de 0.25 mg/mL, determinado para *A. baumannii* y *C. albicans*, empleando en ambos casos DMSO como disolvente. Además, este compuesto exhibió una eficacia antimicrobiana considerable con un MIC de 0.5 mg/mL contra diversas bacterias gram-negativas, incluyendo *K. pneumoniae,* S. Typhimurium*, S. marcescens* y *P. aerogenes*. Su efectividad también se extendió a bacterias gram-positivas, como *S. aureus, B. subtilis* y *S. agalactiae.* En contraste, algunas bacterias demostraron ser menos susceptibles a TER, presentando valores de MIC más elevados. Entre estas se encuentran *E. coli, E. faecalis, L. monocytogenes* y *K. aerogenes*, lo que sugiere mecanismos de resistencia o menor permeabilidad a la acción del compuesto. En particular, *P. aeruginosa* mostró la menor sensibilidad entre todas las cepas evaluadas.

Finalmente, la relación MBC/MIC fue <4 en todos los casos evaluados, indicando que el compuesto no solo inhibe el crecimiento bacteriano, sino que es capaz de eliminar activamente los microrganismos.

Tabla 19: Cuantificación MICs bacterianas para cada producto natural

Producto natural	Número de cepas BACTERIANAS distintas en las que se detectó MIC
Ácido ferúlico	0
Citronellal	1
Hidroquinona	10
Lisozima	1
Mentol	3
Papaína	0
Terpineol	12

Elaboración propia.

7.2.6 Selección de productos naturales con mayor actividad antimicrobiana

Se observa en la tabla 19 que el TER y la HQ destacan como los dos productos naturales con mayor actividad bacteriana, presentado MICs sobre 12 y 10 cepas bacterianas distintas respectivamente.

El propósito principal de esta tesis, desde la perspectiva del estudio antimicrobiano, es identificar combinaciones entre productos naturales y antibióticos que presenten efectos sinérgicos. Para considerar que existe sinergia, es necesario que la MIC tanto del antibiótico como del producto natural se vean reducidas al ser utilizados en combinación respecto a los valores observados cuando se emplean por separado. Por tanto, los productos naturales seleccionados para continuar con la experimentación han sido el TER y la HQ al ser los dos compuestos que han demostrado una mayor actividad antimicrobiana individual, descartándose el resto al presentar una menor eficacia.

La mayoría de los estudios disponibles sobre la actividad antimicrobiana de TER se han centrado en su efecto como componente de aceites esenciales (Erdoğan Eliuz 2021, Benhadid et al. 2022, Srisukh et al. 2012), lo que dificulta aislar su contribución específica frente a los demás compuestos presentes en ellos. Empleado como compuesto puro, la información disponible es más limitada, habiéndose evaluado su actividad antimicrobiana frente a un número reducido de bacterias, principalmente *S. aureus,* S. Typhimurium y *E. coli*. Hasta la fecha no se conoce información sobre la actividad del TER frente a *B. subtilis*, *A. baumannii*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aerogenes, P. mirabilis y S. marcescens* y apenas hay valores de MIC para el resto de bacterias. Por ejemplo, se han documentado valores similares a los obtenidos en esta investigación frente a *E. faecalis* (Freire et al. 2021) y algo más elevados frente a *L. monocytogenes* (Yang et al. 2014).

En el caso de la HQ la evidencia experimental sobre su actividad antimicrobiana es aún más limitada. Los estudios previos se han centrado mayoritariamente en bacterias como *S. aureus, E. coli y P. aeruginosa*, con escasas referencias a su eficacia frente a otros patógenos. Sólo se ha identificado una fuente que reporta valores de MIC de HQ frente a *E. faecalis* (Jurica et al. 2017), *K. pneumoniae* (Jurica et al. 2017) y S.

Typhimurium (Kim et al. 2010). En líneas generales, los valores obtenidos en esta investigación se sitúan dentro del rango de los reportados en la literatura.

En la tabla 20 se recopilan los valores de MIC del TER y la HQ frente a estas y otras cepas de las mismas bacterias documentados en estudios previos:

Tabla 20: MICs bibliográficas hidroquinona y terpineol sobre las bacterias seleccionadas

Bacteria	MIC TER (mg/mL) [ATCC]		MIC HQ (mg/mL) [ATCC]	
	Experimental	Bibliográfica	Experimental	Bibliográfica
B. subtilis	0.5[a] [ATCC 6633]	No se encontró información bibliográfica específica	2 [ATCC 6633]	No se encontró información bibliográfica específica
E. faecalis	2[b] [ATCC 19433]	2 [ATCC 29212] (Freire et al. 2021)	>2 [ATCC 19433]	0.2 [ATCC 29212] (Jurica et al. 2017)
L. monocytogenes	2[b] [ATCC 7644]	3 [ATCC 19114] (Yang et al. 2014) 1.85 [ATCC 19114] (Ben Akacha et al. 2024)	0.5 [ATCC 7644]	No se encontró información bibliográfica específica
S. aureus	0.5[b] [ATCC 9144]	0.255 [ATCC 6538] (Badawy et al. 2019) 0.75 [/] (Wang, Chen and Hou 2019a) 1.55 [ATCC 25923] (Albano et al. 2016) 1.5 [ATCC 25923] (Yang et al. 2014) 0.03 [ATCC 25923] (Guimarães et al. 2019) 0.1 [ATCC 25923] (Fink 2023) 1.87 [ATCC 25923] (Ben Akacha et al. 2024)	1 [ATCC 9144]	0.015 [/] (Jeyanthi et al. 2021) >0.4 [ATCC 25923](Kim et al. 2022a) 0.012-0.1 [/] (Morshdy et al. 2023) 0.064 [/] (Kim et al. 2010) 0.31-1.25 [/] (Ma et al. 2019)
S. agalactiae	0.5[a] [ATCC 12386]	0.098 [/] (Zhang et al. 2018c)	>2 [ATCC 12386]	No se encontró información bibliográfica específica
A. baumannii	0.25[a] [ATCC 19606]	No se encontró información bibliográfica específica	1 [ATCC 19606]	No se encontró información bibliográfica específica
E. coli	1[c] [ATCC 25922]	0.055 [ATCC 8739] (Badawy et al. 2019) 0.75 [/] (Wang et al. 2019a) 0.25 [ATCC 43895] (Albano et al. 2016) 3 [ATCC 43895] (Yang et al. 2014) 0.06 [ATCC 8739] (Guimarães et al. 2019) 0.76-1.56 [/] (Huang et al. 2021) 0.1 [ATCC 25922] (Fink 2023) 0.45 [ATCC 25922] (Ben Akacha et al. 2024)	>2 [ATCC 25922]	0.256 [/] (Kim et al. 2010) 0.4 [ATCC 25922] (Jurica et al. 2017)
K. aerogenes	1[a] [ATCC 13048]	No se encontró información bibliográfica específica	2 [ATCC 13048]	No se encontró información bibliográfica específica
K. pneumoniae	0.5[a] [/]	No se encontró información bibliográfica específica	2 [/]	0.8 [ATCC 700603] (Jurica et al. 2017)
P. aerogenes	0.5[a] [ATCC 27883]	No se encontró información bibliográfica específica	1 [ATCC 27883]	No se encontró información bibliográfica específica
P. mirabilis	- [ATCC 35659]	No se encontró información bibliográfica específica	2 [ATCC 35659]	No se encontró información bibliográfica específica
P. aeruginosa	>2 [ATCC 27853]	0.2 [ATCC 27853] (Albano et al. 2016)	>2 [ATCC 27853]	0.008 [/] (Jeyanthi et al. 2021) 0.4 [ATCC 27853] (Jurica et al. 2017)
S. Typhimurium	0.5[c] [ATCC 13311]	0.47 [/] (Wang et al. 2019a) 1.5 [ATCC 6539] (Yang et al. 2014) 0.12 [ATCC 14028] (Guimarães et al. 2019) 0.76-1.56 [/] (Huang et al. 2021) 0.1 [ATCC 14028] (Fink 2023) 1.85 [ATCC 43972] (Ben Akacha et al. 2024)	2 [ATCC 13311]	0.512 [/] (Kim et al. 2010)
S. marcescens	0.5[a] [ATCC 13880]	No se encontró información bibliográfica específica	1 [ATCC 13880]	No se encontró información bibliográfica específica
C. albicans	0.25[a] [ATCC 10231]	0.156 [ATCC 60193] (Martorano-Fernandes et al. 2021)	>2 [ATCC 10231]	>0.4 [ATCC 10231] (Kim et al. 2022b) 25.6 [ATCC 10231] (Jurica et al. 2017)

[a]DMSO [b]T20 [c]T80
[/] Registro ATCC no encontrado
Elaboración propia. Varias fuentes

TER es un compuesto con naturaleza moderadamente lipofílica, baja solubilidad en agua y tamaño molecular relativamente pequeño (Tabla 9), características que favorecen su difusión a través de las bicapas lipídicas y le confieren una alta afinidad por estructuras ricas en lípidos como las membranas celulares bacterianas. Al igual que otros monoterpenos similares, se ha sugerido que el mecanismo de acción del TER implica su incorporación a las membranas celulares bacterianas, lo que provoca una alteración en su integridad (Trombetta et al. 2005). Esta desestabilización estructural conduce a un aumento en la permeabilidad de la membrana, provocando la fuga de componentes intracelulares esenciales como lípidos y proteínas, y derivando finalmente en la lisis celular (Oyedemi et al. 2009, Yang et al. 2014).

El mecanismo de acción parece ser efectivo tanto en bacterias gram-positivas como en gram-negativas, aunque con ciertas diferencias debido a la composición de sus envolturas celulares. En el caso de las bacterias gram-positivas, TER interactúa directamente con la membrana plasmática, mientras que en las gram-negativas, su efecto se extiende también a la membrana externa, debido a su estructura fenólica, que facilita su penetración a través de la barrera lipopolisacárida (Oyedemi et al. 2009).

La alteración en la permeabilidad de la membrana bacteriana podría también facilitar su acceso al citoplasma, donde podría afectar otras estructuras subcelulares. En este sentido, se ha propuesto que TER podría generar un daño secundario en orgánulos como las mitocondrias (Sikkema, de Bont and Poolman 1994), interfiriendo con procesos bioquímicos esenciales y desembocando en la muerte celular. Estas alteraciones han sido observadas en estudios con *E. coli* expuesta a este compuesto, demostrando una disminución del tamaño celular, alteraciones en la forma, pérdida de citoplasma y, finalmente, plasmólisis y vacuolización celular (Li et al. 2014).

Por su parte, la HQ es un compuesto fenólico de bajo peso molecular y moderada solubilidad en agua (Tabla 9), características que le confieren una buena capacidad de difusión tanto en medios acuosos como a través de las estructuras lipídicas. Estas propiedades unidas a su estructura química sencilla le permiten interactuar de manera eficiente con las bicapas lipídicas bacterianas. Se ha propuesto que la HQ actúe como una impureza dentro de la organización de la membrana plasmática, insertándose entre los fosfolípidos y alterando su disposición (Jeyanthi et al. 2021). Esta alteración de la estructura genera una pérdida de su integridad, lo que se traduce en un aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana, provocando la fuga de componentes

intracelulares como iones y proteínas, lo que compromete la homeostasis de la bacteria y conduce finalmente a la lisis celular (Ma et al. 2019).

Además de esta acción desestabilizadora que ejerce sobre la envoltura celular, la HQ presenta capacidad de oxidación. En presencia de oxígeno u otros aceptores de electrones, la HQ puede oxidarse espontáneamente a *p*-benzoquinona, una forma altamente reactiva. Este derivado es capaz de generar ROS que contribuyen al estrés oxidativo intracelular. Estas especies oxidantes pueden inducir daño a lípidos de membrana (lipoperoxidación), proteínas (desnaturalización e inactivación) y ácidos nucleicos (rupturas en el ADN y modificaciones de bases), lo que refuerza el efecto letal sobre la célula bacteriana (Panda et al. 2025). Esta capacidad de causar daño oxidativo intracelular, sumada a su efecto directo disruptivo sobre la membrana, confiere un mecanismo de acción complejo difícil de contrarrestar por las bacterias.

La HQ ha demostrado eficacia frente a bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, aunque con mayor actividad sobre las primeras (Tabla 20). En bacterias con doble membrana, su penetración puede verse limitada por la membrana externa, pero su tamaño reducido y equilibrio entre hidrosolubilidad y lipofilia favorecen su inserción y su acceso al citoplasma, donde puede interferir en procesos esenciales (Ma et al. 2019, Panda et al. 2025).

En base a las referencias obtenidas, tanto el TER como la HQ han evidenciado mecanismos de acción complejos que incluyen disrupción de la membrana celular, alteraciones estructurales internas y generación de estrés oxidativo. Esto los posiciona como candidatos prometedores para el desarrollo de estrategias antimicrobianas eficaces.

7.2.7 Concentración mínima inhibitoria de los antibióticos

Finalmente, los resultados obtenidos de estudiar las MIC de los antibióticos sintéticos frente a las bacterias seleccionadas se encuentran recogidos en la tabla 21.

Tabla 21: MICs de los antibióticos sintéticos frente a las cepas bacterianas seleccionadas para esta investigación

Antibiótico		*B. subtilis*	*E. faecalis*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*S. agalactiae*	*A. baumannii*	*E. coli*	*K. aerogenes*	*K. pneumoniae*	*P. aerogenes*	*P. aeruginosa*	*S.* Typhimurium	*S. marcescens*
Amoxicilina	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.5**	<0.01	<0.01	<0.01	**0.125**	<0.01	>5	**0.25**	>500	/	**0.0625**	**0.125**
Ampicilina	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.5**	>5	<0.01	<0.01	**0.125**	<0.01	>5	**0.125**	>500	/	**0.0156**	**0.125**
Cloranfenicol	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.25**	<0.01	<0.01	<0.01	**0.0625**	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	**0.125**
Clortetraciclina	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01
Estreptomicina	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.125**	**0.25**	**0.0625**	**0.125**	**0.0156**	**0.0312**	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01
Eritromicina	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.125**	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	**0.5**	**0.0625**	**0.0625**	>500	/	**0.0312**	**0.0156**
Florfenicol	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.0625**	**0.0156**	**0.0312**	<0.01	<0.01	**0.0625**	**0.0312**	<0.01	<0.01	/	<0.01	**0.0312**
Gentamicina	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.5**	**0.5**	**0.0156**	**0.0156**	**0.0156**	**0.0625**	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01
Neomicina	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	**0.0625**	**0.0156**	<0.01	<0.01	**0.0312**	**0.0312**	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01
Oxitetraciclina	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01
Penicilina G	MIC (mg/mL)	<0.01	>5	>5	<0.01	<0.01	**0.5**	>5	>5	>5	>5	/	>5	>5
Sulfadiazina	MIC (mg/mL)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	/	*	*
Tetraciclina	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	**0.0625**

Elaboración propia.

** Sulfadiazina no se pudo disolver en agua por lo que no se empleó en los ensayos.*

/ P. aeruginosa no se estudió al no haber MIC ni para TER ni para HQ por lo que no se pueden establecer posibles sinergias.

7.3 BLOQUE III: Ecotoxicidad de los productos naturales con actividad antimicrobiana

Una vez identificados la HQ y el TER como los compuestos naturales con mayor actividad antimicrobiana en el bloque anterior, el siguiente paso lógico dentro del enfoque integral de esta tesis doctoral consiste en evaluar su impacto ambiental. Este bloque III responde a la necesidad de valorar no solo la eficacia de estos compuestos como posibles alternativas a los antibióticos, sino también su seguridad ecológica, en consonancia con el doble enfoque que sustenta este trabajo: eficacia terapéutica y sostenibilidad ambiental.

En consecuencia, en este bloque se aborda la evaluación de la toxicidad ambiental de la HQ y el TER de forma individual, mediante ensayos ecotoxicológicos realizados con organismos indicadores y comunidades microbianas representativas de ecosistemas acuáticos y terrestres. Este análisis resulta esencial para determinar su idoneidad como alternativas reales a los antibióticos sintéticos y permite avanzar hacia el cumplimiento del tercer objetivo específico planteado en esta tesis:

> **OBJETIVO III**: "Evaluar la ecotoxicidad de aquellos compuestos naturales que presenten una actividad antimicrobiana destacada"

Los resultados referentes a la ecotoxicidad de la HQ que se presentan a continuación han sido publicados en el artículo:

Valenzuela, A., Ballestero, D., Gan, C., Lorca, G., Langa, E., Pino-Otín, M., 2024. Hydroquinone Ecotoxicity: Unveiling Risks in Soil and River Ecosystems with Insights into Microbial Resilience. TOXICS 12 (Q1, Factor de Impacto: 4.1).

En este estudio se presentan los resultados obtenidos del potencial tóxico de la HQ a través de un enfoque integral que incluyó la evaluación de organismos bioindicadores pertenecientes a distintos nichos ecológicos, así como el análisis del impacto sobre comunidades microbianas ambientales. Para caracterizar los efectos en ecosistemas acuáticos se utilizaron los organismos modelo *D. magna* y *A. fischeri*. En

paralelo, se valoró la toxicidad en medios terrestres mediante bioensayos con *E. fetida* y *A. cepa*. De forma complementaria, se examinó cómo la HQ afecta la estructura y funcionalidad de comunidades microbianas autóctonas extraídas de agua fluvial y suelos agrícolas. Para ello, se aplicaron metodologías basadas en la secuenciación del gen 16S rRNA, así como pruebas metabólicas mediante el sistema Biolog EcoPlate™.

El texto completo de dicho artículo se incluye en el **Anexo 3.1** para su consulta.

Asimismo, los resultados obtenidos con el compuesto TER que aparecen en esta tesis formarán parte de un futuro artículo. Estos resultados incluyeron no solo a los mismos bioindicadores utilizados para la HQ, sino también a comunidades bacterianas acuáticas naturales, con el fin de poder establecer la comparativa que se presenta a continuación.

7.3.1 Resumen

Este bloque de investigación se centra en el estudio ecotoxicológico de dos compuestos de origen natural como son la HQ y el TER que, pese a su naturaleza, poseen un considerable potencial de liberación al medio ambiente debido a su uso extensivo en diversos sectores productivos. Tal y como se mencionó en el apartado de Materiales, la HQ es empleada habitualmente como agente despigmentante en cosmética, intermedio químico en procesos industriales y componente de productos fotográficos (Fabian et al. 2025), mientras que el TER forma parte de mezclas volátiles utilizadas en agricultura, perfumería y formulaciones farmacológicas (Khaleel et al. 2018, Bhatia et al. 2008). La amplitud de sus aplicaciones, combinada con patrones de uso frecuente y escasa regulación en lo referente a su vertido al medio o eliminación, incrementa la probabilidad de que estos compuestos alcancen ecosistemas acuáticos y terrestres.

A diferencia de los contaminantes sintéticos, cuya toxicidad ha sido ampliamente documentada, los productos naturales han sido tradicionalmente considerados como inocuos por su origen biológico, lo que ha llevado a una menor representación en la literatura ecotoxicológica. No obstante, su uso intensivo en sectores como la cosmética, la industria alimentaria o la agricultura, y su potencial liberación al medioambiente derivada, hace necesario abordar de manera rigurosa sus posibles efectos sobre organismos no diana y procesos ambientales esenciales.

En este contexto, el presente bloque constituye una contribución significativa al campo de la ecotoxicología de productos naturales, al abordar de forma sistemática la evaluación del impacto ambiental de HQ y TER mediante un enfoque que integra tanto organismos modelo representativos de distintos niveles tróficos como comunidades microbianas naturales de relevancia ecológica. La estrategia experimental adoptada mantiene una continuidad metodológica con respecto a los bloques anteriores, lo que garantiza la coherencia interna del diseño de investigación y permite una comparación rigurosa entre los efectos observados para compuestos naturales y los previamente analizados para antibióticos sintéticos.

Para la evaluación de la toxicidad se utilizaron bioindicadores ampliamente validados en estudios ecotoxicológicos, como *Daphnia magna* y *Aliivibrio fischeri* en el medio acuático, y *Eisenia fetida* y *Allium cepa* en el entorno edáfico. Estos organismos fueron seleccionados por su sensibilidad reconocida, su papel ecológico representativo y su uso estandarizado en normativas internacionales, lo que facilita la extrapolación de los resultados a condiciones ambientales reales. A esta aproximación se añadió una dimensión microbiológica, centrada en el estudio de comunidades bacterianas nativas extraídas de sistemas acuáticos y terrestres, cuya respuesta ante la exposición a HQ y TER fue analizada tanto desde una perspectiva estructural mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA, como funcional, a través de la evaluación de perfiles metabólicos utilizando el sistema Biolog EcoPlate™.

Este enfoque integrador, que combina el análisis de organismos individuales con el estudio detallado de comunidades microbianas naturales, permite una evaluación ecotoxicológica más completa y realista del impacto de HQ y TER. La incorporación simultánea de herramientas taxonómicas —como la secuenciación del gen 16S rRNA— y funcionales —mediante perfiles metabólicos con Biolog EcoPlates™— posibilita no solo la detección de efectos tóxicos agudos o crónicos sobre la biodiversidad microbiana, sino también la identificación de alteraciones en procesos ecológicos esenciales, como el metabolismo del carbono, la degradación de materia orgánica o la capacidad de procesamiento de nutrientes. Esta doble aproximación resulta especialmente valiosa para evidenciar impactos subletales o disfunciones ecosistémicas que pueden pasar desapercibidas en estudios centrados únicamente en la composición de las comunidades.

El valor añadido de este bloque es su función estratégica dentro del marco global de la tesis. Más allá de la caracterización ambiental de los compuestos estudiados, los

resultados obtenidos permiten sentar las bases científicas para avanzar hacia la siguiente etapa experimental: la evaluación de efectos combinados entre productos naturales y antibióticos sintéticos. En este sentido, la identificación de concentraciones umbral, modos de acción y tipos de respuesta en organismos sensibles constituye un paso previo indispensable para diseñar combinaciones más seguras, minimizar efectos sinérgicos no deseados y avanzar hacia una gestión ambiental más informada de estos compuestos emergentes.

7.3.2 Información específica sobre material y métodos

El análisis de ecotoxicidad de la HQ y del TER se ha realizado siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1. La tabla 22 recoge las concentraciones de cada antibiótico empleadas en cada uno de los ensayos realizados:

Tabla 22: Concentraciones de productos naturales empleadas en ensayos de toxicidad

Ensayo	Producto natural	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5
D. magna	HQ	0.01 µg/mL	0.1 µg/mL	0.5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL
	TER	20 µg/mL	40 µg/mL	60 µg/mL	80 µg/mL	120 µg/mL
A. fischeri	HQ	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
	TER	0.01 µg/mL	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg
A. cepa	HQ	0.03 µg/mL	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL	300 µg/mL
	TER	0.03 µg/mL	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL	300 µg/mL
E. fetida	HQ	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
	TER	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg	10 mg/Kg	100 mg/Kg	1000 mg/Kg
Comunidades microbianas	HQ	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-
	TER	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-

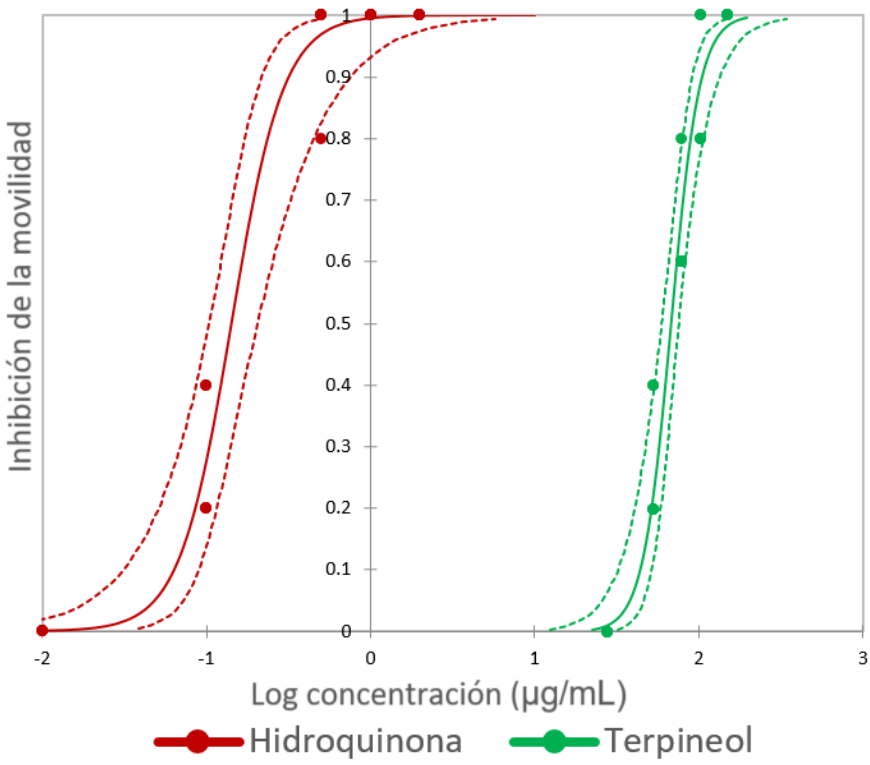
Elaboración propia.

7.3.3 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *D. magna*

La figura 35 muestra la curva de dosis respuesta para la HQ y el TER frente a *D. magna.* En esta gráfica se observa una clara relación entre la concentración de cada compuesto y la inmovilización del movimiento observada en los organismos expuestos.

Los valores específicos de Lc_{50} de ambos productos naturales se encuentran recogidos en la tabla 23, donde puede observarse un mayor efecto perjudicial de la HQ sobre las *D. magna.*

Figura 35: Toxicidad de los productos naturales sobre D. magna tras 24h de exposición



Curva dosis-respuesta para D. magna tras 24h de exposición a Hidroquinona y Terpineol. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia

Tabla 23: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para los productos naturales empleados sobre los indicadores seleccionados

	D. magna **(µg/mL)**		***A. fischeri*** **(µg/mL)**		***E. fetida*** **(mg/Kg)**		***A. cepa*** **(µg/mL)**		**Comunidad microbiana agua (µg/mL)**		**Comunidad microbiana suelo (µg/mL)**	
	LC_{50} (24h)	**LC_{10} (24 h)**	**EC_{50} (30´)**	**EC_{10} (30´)**	**LC_{50} (14 d)**	**LC_{10} (14d)**	**EC_{50} (72h)**	**EC_{10} (72h)**	**LC_{50} (120h)**	**LC_{10} (120h)**	**LC_{50} (120h)**	**LC_{10} (120h)**
HQ	0.14[(1)] (0.10–0.20)	0.06 (0.03-0.09)	1.45[(2)] (1.15-1.80)	0.026 (0.016-0.040)	234.05 (184.14-281.18)	113.80 (67.10-151.58)	7.63 (6.72-8.68)	318.44 (252.69-409.99)	33.86 (21.23-56.26)	2.37 (1.04-4.31)	121.99 (93.14-160.56)	20.91 (12.04-30.82)
TER	51.23 (44.66-57.49)	32.28 (23.17-38.39)	17.65 (15.95-19.49)	5.593 (4.406-6.714)	55.79 (47.77-62.14)	36.19 (23.66-43.57)	50.55 (40.81-63.57)	>1000	203.43 (94.83-1751.84)	2.74 (0.08-8.19)	57.10 (38.43-82.82)	3.02 (1.09-5.92)

(1) LC_{50} (24h) = 0.15 µg/mL (Tissot et al. 1985, Crisinei et al. 1994)
LC_{50} (48h) = 0.25-0.28 µg/mL (Lin et al. 2008)
(2) LC_{50} (5min) = 0.08 µg/mL (Calza, Massolino and Pelizzetti 2008)
LC_{50} (5min) = 0.041 µg/mL (Santos et al. 2004)
Elaboración propia.

La HQ ha demostrado poseer una elevada toxicidad con un valor de Lc_{50} calculado a las 24 horas de exposición de 0.14 (0.10–0.20) µg/mL. La elevada toxicidad de este compuesto ya ha sido documentada previamente en *D. magna* (Lu et al. 2013), mostrando valores de Lc_{50} tras 24 de exposición de 0.15 µg/mL (Tissot et al. 1985, Crisinei et al. 1994), similares a los obtenidos en esta investigación; y de 0.25-0.28 µg/mL tras 48 horas de exposición (Lin et al. 2008). Además, se ha documentado que *Ceriodaphnia dubia,* otra especie de crustáceo perteneciente a la clase Branchiopora al igual que *D. magna,* posee una sensibilidad similar a la HQ, presentando un valor de Lc_{50} de 0.15 µg/mL (Abugazleh et al. 2023), reforzando la evidencia de la alta toxicidad de la HQ en este tipo de organismos acuáticos.

Por su parte, la toxicidad del TER ha sido menos estudiada y no se han encontrado estudios previos sobre su toxicidad sobre este organismo, por tanto, el valor de Lc_{50} obtenido 51.23 (44.66-57.49) µg/mL es el primer dato reportado de toxicidad sobre esta especie. No obstante, la comparación de estos resultados con referencias sobre otros compuestos naturales similares como pueden ser el ácido tánico o el eugenol, muestran que el TER es menos tóxico que ellos (Ferrando et al. 2024, Pino-Otín et al. 2023b). Esto sugiere que, aunque el TER puede afectar a *D. magna*, su impacto es menor en comparación con otros productos naturales.

Estas diferencias en toxicidad entre ambos compuestos pueden atribuirse a sus propiedades fisicoquímicas. La HQ es una molécula relativamente pequeña (110.1 g/mol), eléctricamente neutra con valores de pKa aproximados de 9.9 y 11.6 (Suresh et al. 2012) lo que facilita su paso a través de las membranas celulares. Esto unido a su elevada solubilidad en agua de 73 g/L a 25ºC (Weaver and Frederikse 1977) favorece su biodisponibilidad en el medio acuático, haciendo que el tracto digestivo sea una de las principales vías de exposición en *D. magna* a este compuesto. Sin embargo, no es muy lipófila (Log Kow=0.59) (Suresh et al. 2012), lo que podría limitar su acumulación en los componentes lipídicos. Una vez en el organismo de las daphnias, puede inducir estrés oxidativo, inhibir la actividad de ciertas enzimas como la topoisomerasa II (Mondrala and Eastmond 2010) o afectar al contenido proteico de la hemolinfa como se ha observado con otros microorganismos (Sladkova and Kholodkevich 2011). Estas alteraciones pueden desencadenar problemas fisiológicos graves incluyendo afectaciones cardiacas (Kuznetsova, Sladkova and Kholodkevich 2010) y neuronales (Cossins and Prosser 1978) comprometiendo la viabilidad de los organismos.

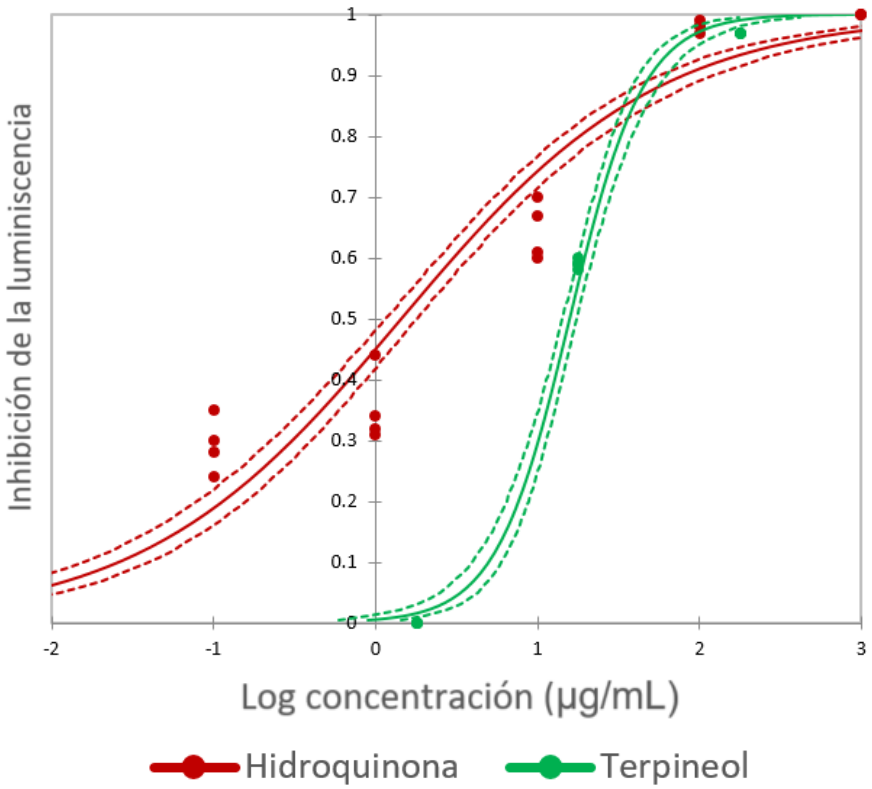
Por otro lado, el TER es un alcohol monoterpenoide con una menor solubilidad en agua (7.1 g/mL) aunque suficiente para garantizar su biodisponibilidad en el medio acuático (National Center for Biotechnology Information, 2025f). Su bajo peso molecular (154.2 g/mol) y su naturaleza de ácido débil facilita su paso a través de las membranas celulares, en las que tiende a quedar adherido alterando la estructura de la bicapa lipídica (Trombetta et al. 2005, Huang et al. 2021). Estas interacciones pueden causar disrupciones en la organización de la membrana, lo que incrementa la permeabilidad celular y, en casos extremos, conduce a la lisis celular (Oyedemi et al. 2009, Yang et al. 2014). Además, a diferencia de la HQ, el TER presenta una moderada hidrofobicidad, lo que favorece su absorción por parte de *D. magna* tanto por contacto directo como por ingestión (Orchard et al. 2002). Este proceso de absorción puede verse potenciado por la acumulación del TER en las interfaces agua-aire, donde *D. magna* puede incorporarlo de manera más eficiente a través de su sistema de filtración (Li et al. 1998).

7.3.4 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *A. fischeri*

La siguiente figura 36 muestra las curvas dosis respuesta de ambos productos naturales (HQ y TER) sobre la bacteria luminiscente *A. fischeri.*

En la tabla 23 se recogen los valores específicos de Ec_{50} de ambos compuestos. Nuevamente se observa que la HQ es más tóxica que el TER para esta bacteria.

Figura 36: Toxicidad de los productos naturales sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición



Curva dosis-respuesta para A. fischeri tras 30 minutos de exposición a Hidroquinona y Terpineol. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

La toxicidad de la HQ en esta bacteria ha mostrado un valor de Ec_{50} de 1.45 (1.15–1.80) µg/mL. Los estudios previos sobre la toxicidad de este compuesto *en A. fischeri* son limitados, ya que la mayoría de las investigaciones se han centrado en evaluar la toxicidad de los subproductos generados durante la degradación de diversos compuestos, entre los que se produce HQ. Entre estos compuestos precursores analizados se incluye el paracetamol (Hamdi El Najjar et al. 2014), la benzidina (Muneer, Singh and Bahnemann 2002), la benzoquinona (Turkay et al. 2018), el sulfametoxazol (Guo et al. 2021), la sulfanilamida (El-Ghenymy et al. 2014) y el ácido clofíbrico (Rosal et al. 2009), entre otros. Es relevante destacar en este punto que la literatura científica coincide en que la HQ es uno de los subproductos más tóxicos, llegando a ser más perjudicial que la propia sustancia precursora.

A nivel cuantitativo, se ha documentado un valor de Ec_{50} en *A. fischeri* de 0.08 mg/L, aunque en este caso el tiempo de exposición fue de solo 5 minutos (Calza et al. 2008). Por otro lado, otra investigación reportó una Ec_{50} de 0.041 mg/L tras 15 minutos de exposición en ensayos de oxidación catalítica del fenol (Santos et al. 2004). En la

presente investigación, el tiempo de exposición utilizado fue de 30 minutos, lo que dificulta la comparación directa de los resultados debido a las diferencias en las metodologías empleadas. No obstante, a pesar de estas variaciones experimentales, todas las investigaciones coinciden en que la HQ representa un compuesto altamente tóxico para este bioindicador acuático.

Hasta la fecha, no se han llevado a cabo estudios específicos que expliquen en detalle el mecanismo de acción de la HQ en *A. fischeri*. Sin embargo, se ha documentado que este compuesto presenta efectos inhibitorios sobre el crecimiento de diversas bacterias patógenas gram-negativas, como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* (Jeyanthi et al. 2016, Jurica et al. 2017, Żbikowska et al. 2017). Además, investigaciones recientes han identificado actividad antimicrobiana de derivados de la HQ en otras especies del género *Aliivibrio* (Sathiyamoorthi et al. 2023, Limna Mol et al. 2020). Curiosamente, estos derivados parecen regular negativamente la expresión de genes involucrados en procesos biológicos clave, como la motilidad bacteriana, la síntesis de proteasas, la producción de índol y la formación de polisacáridos capsulares. Esta regulación génica sugiere que la HQ y sus derivados podrían interferir con la virulencia y la supervivencia de *Aliivibrio spp.*, proporcionando indicios sobre un posible mecanismo de acción en *A. fischeri* (Sathiyamoorthi et al. 2023).

La toxicidad del HQ en *A. fischeri* parece ser menor en comparación con otros organismos acuáticos, como *D. magna*. Esta diferencia podría explicarse por la estructura de la envoltura celular de esta bacteria. Como microorganismo gram-negativo, *A. fischeri* posee una membrana externa rica en lipopolisacáridos podría actuar como una barrera selectiva que limita la entrada del HQ a la célula, reduciendo así su exposición intracelular y atenuando sus efectos tóxicos. Adicionalmente, *A. fischeri* podría utilizar mecanismos de defensa como bombas de eflujo para expulsar la sustancia tóxica, lo que disminuiría su efecto concentración en el citoplasma. Este tipo de sistema de resistencia es común en bacterias gram-negativas y podría explicar la mayor tolerancia de *A. fischeri* frente al HQ en comparación con organismos como *D. magna*, que carecen de este tipo de mecanismos de protección. Sin embargo, una vez que el HQ logra atravesar las barreras celulares y alcanzar el citoplasma bacteriano, es probable que su mecanismo de toxicidad sea similar al observado en *D. magna*, interfiriendo con la producción de energía, la homeostasis redox o la integridad estructural de la célula.

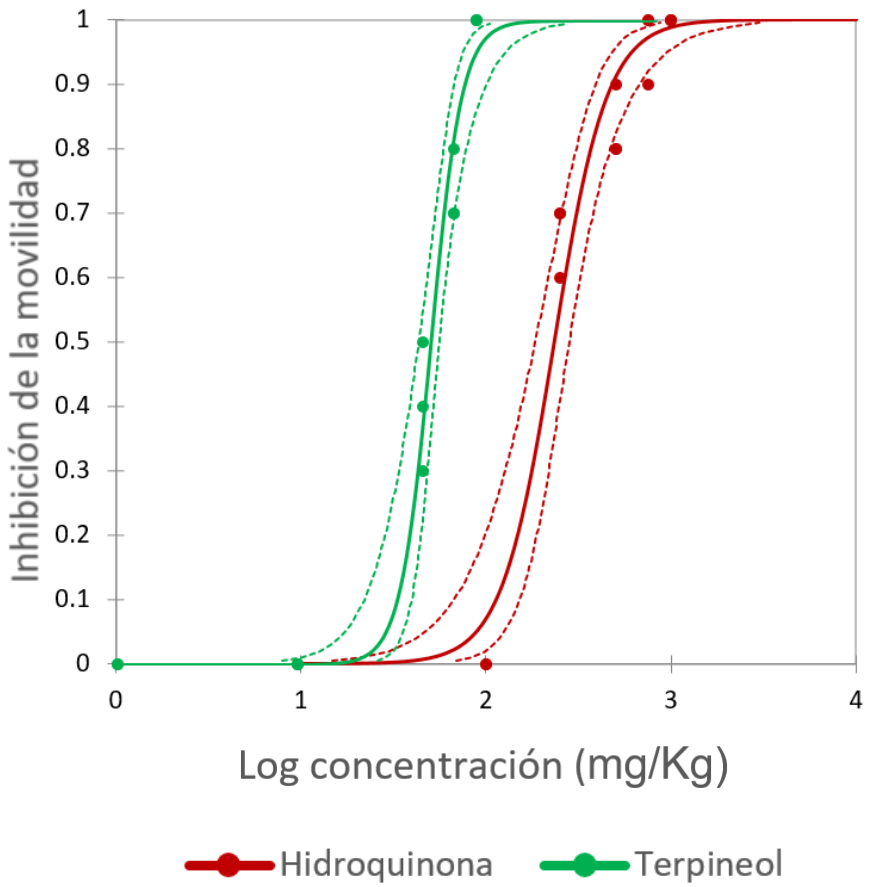
Por su parte, nuevamente no se han encontrado referencias previas sobre la toxicidad del TER en *A. fischeri,* lo que convierte a el valor de Ec_{50} obtenido 17.65 (15.95-19.49) µg/mL en el primer dato documentado de toxicidad de este compuesto sobre esta especie. La comparación de valores de toxicidad sugiere que su impacto ecotoxicológico es, al igual que en caso de *D. magna*, relativamente menor en comparación con otras sustancias de origen natural (Ferrando et al. 2024, Pino-Otín et al. 2023b).

Se ha demostrado que el compuesto TER afecta tanto la membrana externa de la pared celular de las bacterias gramnegativas como, posteriormente, la membrana plasmática. Este doble nivel de acción facilitaría su entrada en la célula, incrementando su toxicidad y pudiendo desencadenar un efecto en cascada que comprometa estructuras internas esenciales (Huang et al. 2021). Una vez dentro de la célula, TER podría generar daños adicionales a nivel de los orgánulos internos, especialmente mediante la alteración de la integridad de las membranas mitocondriales. Este mecanismo ha sido ampliamente descrito en estudios previos sobre la acción de compuestos lipofílicos en otros microorganismos, donde se ha observado que estos pueden insertarse en la bicapa lipídica, alterando su fluidez y provocando pérdida de la homeostasis celular (Sikkema et al. 1994). En este contexto, los efectos citotóxicos de TER podrían ir más allá de la simple disrupción de la membrana plasmática, afectando también la funcionalidad de procesos bioquímicos esenciales dentro de la célula. Estudios previos han demostrado estos efectos en bacterias gram-negativas como *E. coli*, donde se han observado fenómenos como fuga del contenido citoplasmático, deformación del área nuclear y plasmólisis celular, indicando un daño severo a la estructura y viabilidad de la bacteria (Li et al. 2014). Estos hallazgos sugieren que la interacción de TER con las membranas celulares podría representar un mecanismo clave de toxicidad en bacterias gram-negativas, impactando su integridad estructural y, en última instancia, comprometiendo su supervivencia.

7.3.5 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *E. fetida*

La respuesta dosis-dependiente de la lombriz de tierra expuesta a HQ y TER se muestra en la Figura 37, habiéndose obtenidos unos valores de Lc_{50} de 234.05 (184.14–281.18) mg/kg y de 55.79 (47.77-62.14) mg/kg para la HQ y el TER respectivamente como se recogen en la tabla 23.

Figura 37: Toxicidad de los productos naturales sobre E. fetida tras 7 días de exposición



Curva dosis-respuesta para E. fetida tras 7 días de exposición a Hidroquinona y Terpineol. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

Los resultados obtenidos demuestran que, si bien *Eisenia fetida* es el bioindicador más resistente entre los cuatro organismos evaluados, sigue exhibiendo una toxicidad detectable cuando se expone tanto a la HQ como al TER. En ambos casos, se identifican efectos adversos que, aunque no siempre letales a concentraciones bajas, pueden comprometer funciones fisiológicas clave del organismo.

Aunque en la literatura existen algunas referencias sobre la toxicidad de compuestos relacionados con la HQ, estas suelen centrarse en derivados químicos o en otras especies de lombrices. Por ejemplo, estudios de exposición con diversos poliésteres que contienen HQ han mostrado tasas de supervivencia superiores al 80 % en *E. fetida* después de 14 días, lo que sugiere un nivel moderado de toxicidad para estos bioindicadores (Wang et al. 2023a). Estudios previos han evidenciado que algunas especies de lombrices de tierra pueden ser más susceptibles al estrés oxidativo inducido por quinonas. En particular, *Lumbricus rubellus* y *Allolobophora chlorotica* han mostrado

una mayor sensibilidad a la toxicidad de estos compuestos en comparación con *E. fetida*. Esta diferencia podría estar relacionada con la actividad enzimática de estos organismos, específicamente con la presencia y actividad de DT-diaphorasa, una enzima clave en la detoxificación de quinonas. La baja expresión o deficiencia de esta enzima en algunas especies de lombrices podría hacerlas más vulnerables a los efectos tóxicos del HQ y sus derivados (Osman, Den Besten and van Noort 2003).

En el caso del TER, los estudios de toxicidad aguda reportan valores de LC_{50} entre 499 y 799 mg/kg de suelo seco, lo que lo clasifica como un compuesto de toxicidad moderada para *E. fetida* (Resiniques 2022). A concentraciones inferiores, se han observado subletales como disminución en la movilidad y pérdida del reflejo de escape, lo cual sugiere una acción neurotóxica posiblemente mediada por la disrupción de la función nerviosa (Coats, Karr and Drewes 1991).

Cuando se comparan los valores de toxicidad del obtenidos en *E. fetida* con los de otros compuestos fenólicos de origen vegetal, como el ácido tánico, se observa que tanto la HQ como el TER son significativamente más tóxicos. En el caso del ácido tánico, se han reportado valores de Lc_{50} superiores a 2000 µg/L (Pino-Otín et al. 2023b), lo que indica que estos compuestos son al menos un orden de magnitud más perjudicial para esta especie.

Las lombrices de tierra pueden estar expuestas a la HQ y al TER a través de dos rutas principales: la ingestión de partículas contaminadas y la absorción cutánea. En el primer caso, *E. fetida* ingiere partículas de suelo durante su alimentación, lo que facilita la entrada de estos compuestos en su sistema digestivo. Una vez en el tracto intestinal, los compuestos pueden ser absorbidos y distribuirse a través de los tejidos del organismo, afectando procesos fisiológicos esenciales (Suthar, Singh and Dhawan 2008). Por otro lado, la absorción cutánea ocurre debido a la alta permeabilidad de la cutícula de *E. fetida*, la cual permite un intercambio significativo de agua y solutos con el medio circundante (Saxena, Gupta and Murthy 2014). Esta capacidad de absorción cutánea se ve favorecida por el bajo peso molecular y la ligera hidrofobocidad de la HQ (Bakkali et al. 2008) y por la capacidad para atravesar las membranas biológicas del TER. Aunque ambas vías de exposición pueden contribuir a la toxicidad observada, es probable que la ingestión sea el principal mecanismo por el cual estos productos naturales ejercen sus efectos tóxicos en *E. fetida*. En el caso de HQ podría generar estrés oxidativo en los tejidos internos, comprometiendo la función celular y reduciendo la capacidad de

detoxificación del organismo (Osman et al. 2003). Por su parte, el TER al ser absorbido, puede afectar la función neuromuscular de la lombriz mediante la alteración de la señalización nerviosa, lo que se manifiesta en una reducción de la movilidad y en reflejos inhibidos (Coats et al. 1991).

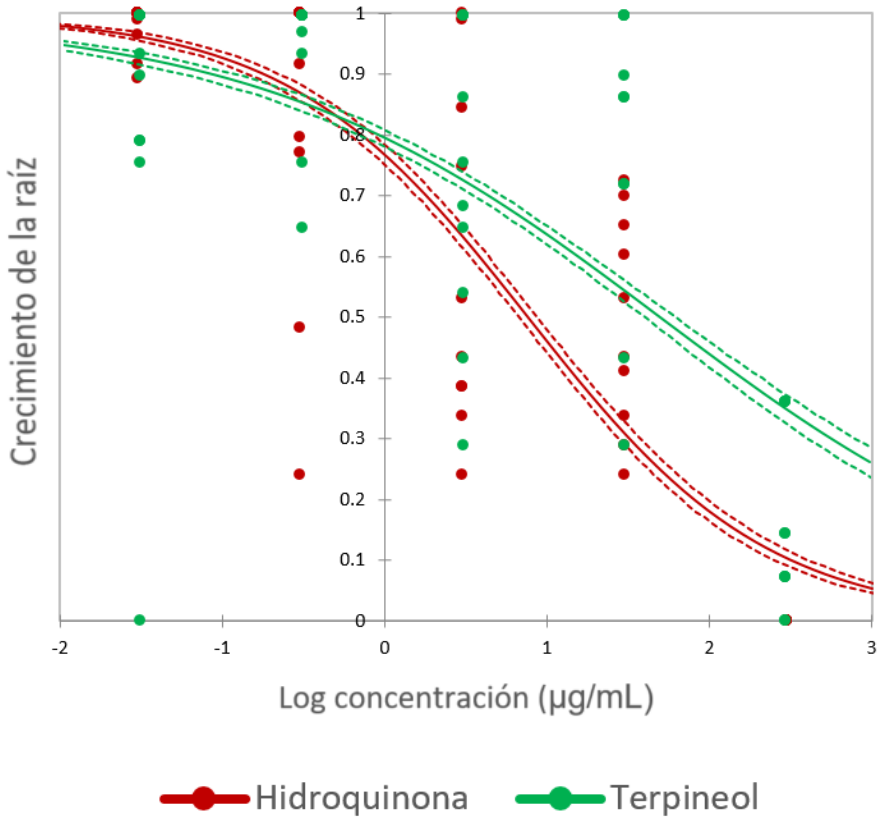
Las lombrices de tierra desempeñan un papel fundamental en la salud y fertilidad del suelo, ya que contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, facilitando la mineralización de nutrientes esenciales para las plantas. Además, mediante su actividad de excavación, airean y mezclan el suelo, mejorando su estructura y favoreciendo la infiltración del agua, lo que optimiza su capacidad de retención de humedad y nutrientes. Asimismo, su interacción con los microorganismos del suelo es clave, ya que su alimentación puede estimular el crecimiento de grupos microbianos beneficiosos y contribuir a la regulación de la microbiota edáfica. La disminución de las poblaciones de lombrices debido a la toxicidad de estos compuestos podría tener consecuencias significativas en la fertilidad del suelo y en el equilibrio del ecosistema. Un impacto negativo sobre estas comunidades no solo reduciría la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas, sino que también deterioraría la calidad del suelo y disminuiría la biodiversidad microbiana, afectando procesos ecológicos fundamentales para la estabilidad y productividad del suelo (Ahmed and Al-Mutairi 2022).

7.3.6 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre *A. cepa*

La Figura 38 presenta la curva dosis-respuesta de la HQ y el TER en *A. cepa* después de 72 horas de exposición, reflejando los efectos diferenciales de ambos compuestos en el crecimiento y desarrollo de las raíces del bulbo.

En la Tabla 23 se presentan los valores específicos de LC_{50} determinados para ambos compuestos. Los resultados confirman, una vez más, que la HQ manifiesta una toxicidad superior en comparación con el TER.

Figura 38: Toxicidad de los productos naturales sobre A. cepa tras 72h de exposición



Curva dosis-respuesta para A. cepa tras 72h de exposición a Clortetraciclina y Neomicina. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

La HQ ha demostrado una elevada fitotoxicidad en *A. cepa*, afectando de manera significativa el crecimiento de las raíces del bulbo y evidenciando su potencial impacto negativo en el desarrollo vegetal. El valor de Ec_{50} obtenido para fue de 7.63 (6.72–8.68) µg/mL, lo que indica que incluso a bajas concentraciones este compuesto puede generar efectos adversos sobre la elongación radicular y, posiblemente, sobre otros procesos celulares esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta.

Estudios previos han documentado que ciertos naturales, como los fenoles, pueden inducir fragmentación cromosómica en *A. cepa* y alterar la mitosis radicular tras la exposición a los mismos (Westman 1949). Sin embargo, la ecotoxicidad específica de la HQ en esta especie vegetal no ha sido previamente cuantificada. No obstante, la HQ sí ha demostrado toxicidad en otras especies vegetales, afectando a distintos parámetros de crecimiento y desarrollo. En *Avena sativa* se ha observado que la exposición a HQ reduce el crecimiento de los brotes mientras que en *Amaranthus retroflexus* se ha

documentado una supresión significativa de su desarrollo (Shettel and Balke 1983). De manera similar, en *Phaseolus vulgaris*, la exposición a HQ afecta negativamente el crecimiento de hojas, raíces y tallos, comprometiendo el desarrollo general de la planta (Keller et al. 2008). Además, este compuesto ha mostrado un fuerte efecto inhibitorio sobre la germinación de *Trigonella foenum-graecum*, lo que sugiere que su impacto podría extenderse a la viabilidad de semillas y al establecimiento de nuevas plantas jóvenes en diversos ecosistemas (Bouknana et al. 2019). Estos hallazgos resaltan el carácter fitotóxico de la HQ y su potencial para alterar la dinámica de las comunidades vegetales en ambientes contaminados.

El mecanismo exacto por el cual la HQ presenta toxicidad en las plantas aún no está completamente elucidado. Investigaciones previas han sugerido que la exposición a este compuesto puede inducir cambios en la polarización de la membrana celular, lo que potencialmente podría afectar al transporte de sustancias esenciales para la homeostasis celular (Keller et al. 2008). No obstante, este efecto parece ser secundario en comparación con otros procesos más determinantes en la toxicidad de la HQ. Se ha propuesto que su modo de acción primario implica un daño severo a la integridad de las membranas celulares, lo que resulta en la pérdida de actividades metabólicas esenciales y de macromoléculas clave. Este proceso suele ir acompañado de un aumento del estrés oxidativo, lo que genera una acumulación de especies reactivas de oxígeno, desencadenando peroxidación lipídica y disrupción de la homeostasis celular (Pandey, Mishra and Singh 2005). La combinación de estos efectos citotóxicos y oxidativos puede llevar a la activación de mecanismos de muerte celular programada, como la apoptosis, un fenómeno previamente observado en células vegetales expuestas a HQ (Bouknana et al. 2019). Esto sugiere que, además de afectar procesos fundamentales del crecimiento vegetal, la HQ puede inducir una respuesta de autodestrucción celular como mecanismo de defensa ante el daño severo, lo que podría explicar la reducción del desarrollo radicular en las plantas expuestas a este compuesto.

Por otro lado, el TER también mostró efectos fitotóxicos en *A. cepa*, aunque con una menor toxicidad en comparación con HQ, registrando un valor de Ec_{50} de 50.55 (40.81–63.57) µg/mL. Esta diferencia sugiere que la HQ es considerablemente más perjudicial para el crecimiento de las raíces que el TER.

Se ha documentado que el TER ocasiona en este bioindicador una reducción de la actividad mitótica en las células de las raíces a partir de 34 µg/mL El mecanismo de

acción propuesto para este monoterpeno implica una alteración en la síntesis de ADN y/o una interrupción del ciclo celular, particularmente en la transición de la fase G2 a la fase M. Esta interrupción impediría que las células completen adecuadamente la mitosis, lo que se traduce en una menor frecuencia de células en división activa (Assunção Ribeiro da Costa et al. 2022). Además de sus efectos citotóxicos, el TER ha demostrado un potencial genotóxico en las raíces de *A. cepa*. En este contexto, se ha observado un incremento significativo en la frecuencia de formación de micronúcleos en células hijas, así como la presencia de células binucleadas, ambas consideradas biomarcadores de daño genético (Assunção Ribeiro da Costa et al. 2022).

Los efectos fitotóxicos del TER no se limitan a *Allium cepa*. En estudios realizados sobre otras especies vegetales, también se ha comprobado su capacidad para interferir con etapas críticas del desarrollo temprano. Por ejemplo, se ha demostrado que el α-terpineol inhibe la germinación de semillas de *Lolium rigidum* (Li et al. 2020a).

En conjunto, estos hallazgos resaltan que tanto la HQ como el TER poseen un potencial fitotóxico significativo en *A. cepa*, aunque mediante mecanismos celulares distintos y con distinta potencia. Mientras que la HQ actúa de forma más agresiva sobre la elongación radicular y la viabilidad celular a bajas concentraciones, el TER manifiesta principalmente efectos citogenéticos a concentraciones más elevadas, lo cual no excluye su impacto en escenarios de exposición prolongada o acumulativa en ambientes contaminados.

7.3.7 Ecotoxicidad de los productos naturales sobre las comunidades microbianas

7.3.7.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua

Las principales características físico-químicas de los ecosistemas acuático y terrestre de los que se obtuvieron las muestras utilizadas en este estudio se detallan en el Anexo 3.2.

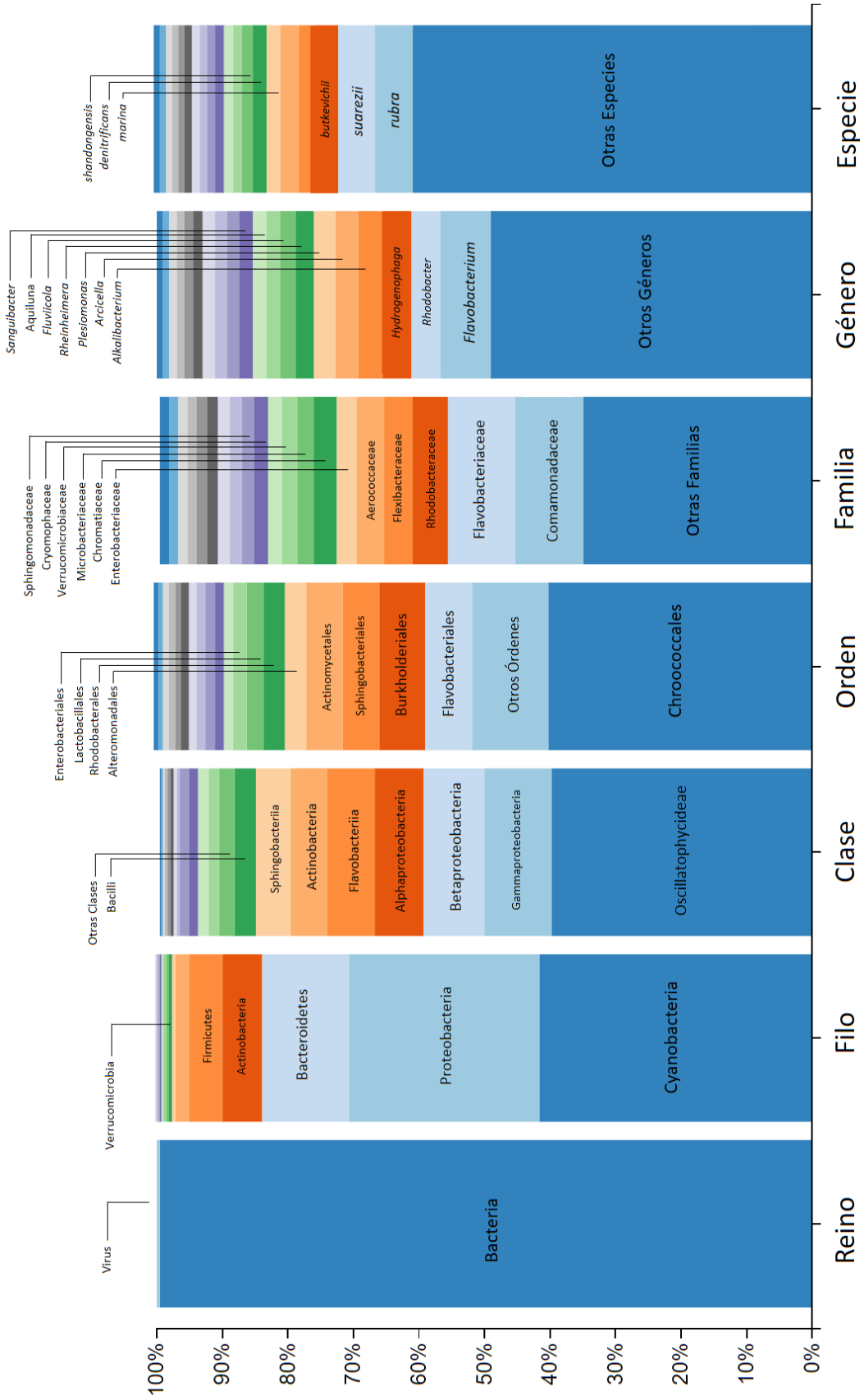
7.3.7.2 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas acuáticas

La Figura 39 muestra los taxones más prevalentes (>2%) de los microorganismos presentes en el río Gállego, distribuidos en cada nivel taxonómico. La secuenciación de estos microorganismos generó un total de 65615 lecturas, todas las cuales superaron los filtros de calidad con una tasa de éxito del 100%, garantizando así la fiabilidad de los datos obtenidos.

El análisis posterior mostró una cobertura exhaustiva de todos los niveles taxonómicos, alcanzando una clasificación superior al 95% en los niveles de filo, clase y orden, más del 50% en familia y género, y un 23.33% a nivel de especie. Esta distribución refleja la progresiva reducción en la capacidad de identificación taxonómica a medida que se profundiza en niveles más específicos, un fenómeno común en estudios de metagenómica ambiental debido a la limitada representación de ciertas secuencias en bases de datos de referencia.

Por otro lado, la Figura 40 presenta una representación visual detallada de los filos bacterianos más predominantes en el ecosistema de este río, utilizando un gráfico de sectores que ilustra sus respectivos porcentajes de abundancia relativa. Esta representación facilita la interpretación de la composición microbiana del río y permite identificar los grupos taxonómicos más relevantes dentro de la comunidad bacteriana. Los tres filos más abundantes fueron *Cyanobacteria* (41.4% de las lecturas bacterianas), *Proteobacteria* (29%) y *Bacteroidetes* (12.2%).

Figura 39: Taxones más prevalentes de los microorganismos del agua en cada nivel taxonómico.



Abundancia relativa de los microorganismos de la muestra de agua secuenciados genéticamente según sus clasificaciones taxonómicas. Elaboración propia.

Figura 40: Principales filos bacterianos en la muestra de agua

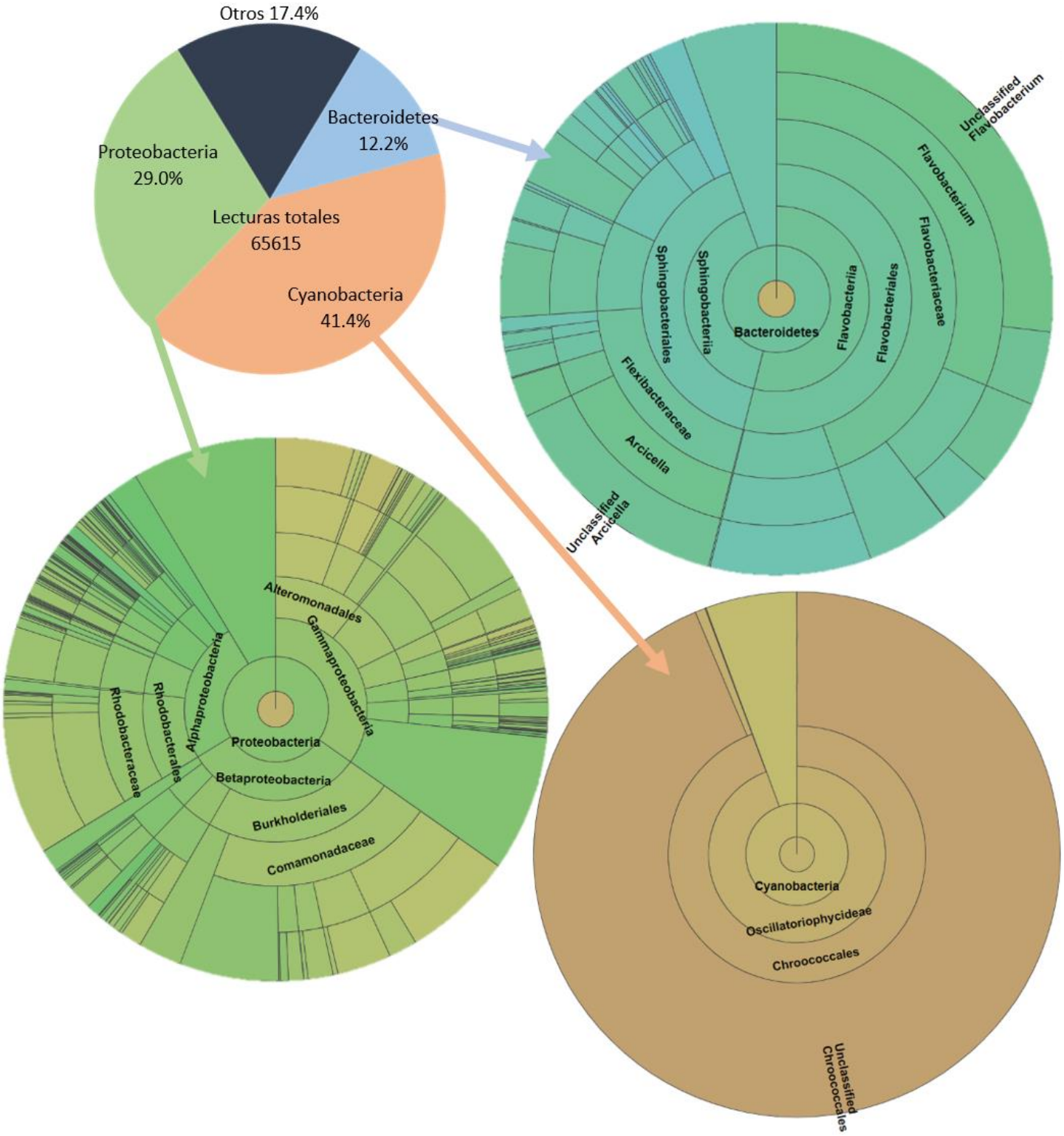


Ilustración de los filos más abundantes detectados en el agua. Elaboración propia.

En análisis de esta muestra reveló un predominio de bacterias pertenecientes a *Cyanobacteria* (41.4%), reconocida por su capacidad fotosintética en ambientes de agua dulce (Genuário et al. 2017, Sun et al. 2017); destacando especialmente la clase *Oscillatoriophycidae* (94.4%). Dentro de ella, el grupo predominante fue el orden *Chroococcales* (99.9%), lo cual coincide con su amplia distribución reportada en sistemas fluviales (McGregor et al. 2007).

Las *Proteobacteria* (29.0%) también mostraron una presencia significativa, repartidas principalmente entre *Gamma-* (34.8%), *Beta-* (31.5%) y *Alphaproteobacteria* (25.1%), reflejando su conocida versatilidad ecológica. Las *Gammaproteobacteria* estuvieron representadas sobre todo por los órdenes *Alteromonadales* (31.0%) frecuentemente reconocido como parte de las comunidades microbianas de los ríos (Xia et al. 2013, Narciso-da-Rocha and Manaia 2016), destacando el orden de los *Pseudomonadales* (8.0%), asociado a la descomposición de materia orgánica y procesos de biorremediación (Zhang et al. 2012, Spain Jim and Gibson David 1991). En las *Betaproteobacteria*, el orden *Burkholderiales* (74.8%) fue particularmente abundante, y en el caso de las A*lphaproteobacteria*, el orden *Rhodobacterales* (42.6%) destacó por su participación en el reciclaje del carbono y otras funciones clave del ecosistema (Kopejtka et al. 2017).

Por último, en el filo *Bacteroidetes*, se identificaron principalmente bacterias de las clases *Flavobacteria* (54.0%) y *Sphingobacteriia* (40.5%), grupos especializados en la degradación de polímeros complejos y materiales orgánicos, funciones esenciales en ambientes acuáticos (Madigan et al. 1997).

7.3.7.3 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas terrestres

La Figura 41 presenta la abundancia relativa de los principales taxones dentro de cada nivel taxonómico resaltando aquellos con una prevalencia superior al 2%.

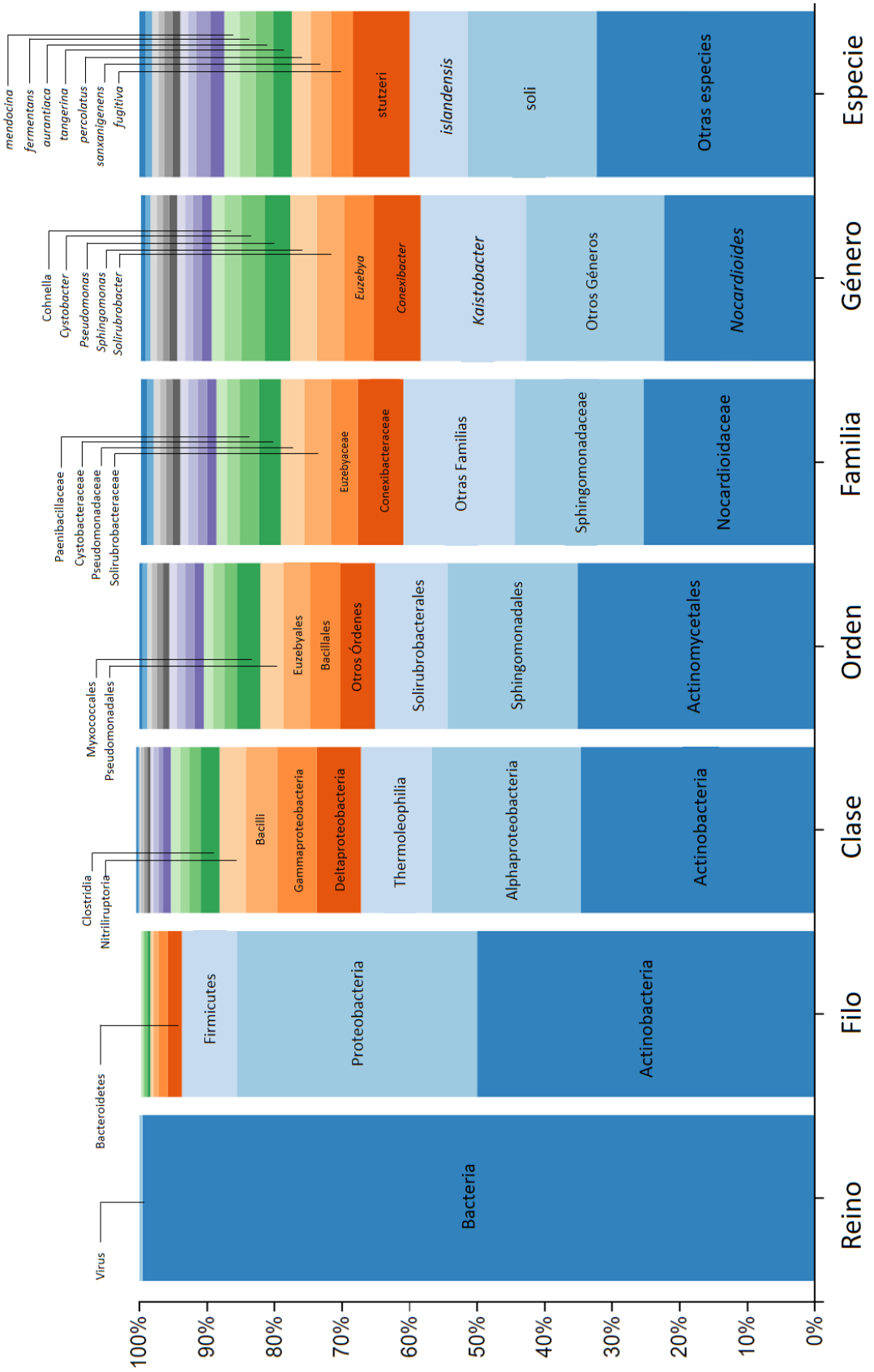
Los resultados del análisis genético de las bacterias del suelo revelan una notable diversidad taxonómica, evidenciando la complejidad y riqueza de la comunidad microbiana presente en este ecosistema. En este estudio, se obtuvieron un total de 61347 lecturas, todas las cuales superaron los filtros de calidad con una tasa de éxito del 100%, lo que garantiza la fiabilidad de los datos y la representatividad del muestreo.

El análisis taxonómico permitió identificar con alta precisión más del 90% de los taxones en los niveles superiores, incluyendo filo, clase, orden y familia. A nivel de género, la identificación alcanzó un 88.63%, mientras que a nivel de especie solo fue posible clasificar el 24.23% de las secuencias. Esta reducción en la identificación taxonómica a medida que se avanza hacia niveles más específicos es una tendencia común en estudios metagenómicos, debido a la falta de referencias completas en las bases de datos y a la presencia de microorganismos aún no caracterizados científicamente.

Seguidamente, la Figura 42 presenta una representación visual detallada que destaca los filos bacterianos más predominantes en las muestras analizadas. Este análisis proporciona una visión clara de la estructura de la comunidad microbiana del suelo, facilitando la identificación de los grupos taxonómicos con mayor presencia

Los resultados indican un claro predominio de dos filos bacterianos: *Actinobacteria*, que representó el 48.7% del total de lecturas bacterianas, y *Proteobacteria*, que constituyó el 34.6% de la composición. Además, se detectó una menor proporción de *Firmicutes*, representando el 8.0% del total de lecturas.

Figura 41: Taxones más prevalentes de los microorganismos del suelo en cada nivel taxonómico.



Abundancia relativa de los microorganismos de la muestra de suelo secuenciados genéticamente según sus clasificaciones taxonómicas. Elaboración propia.

Figura 42: Principales filos bacterianos en la muestra de suelo

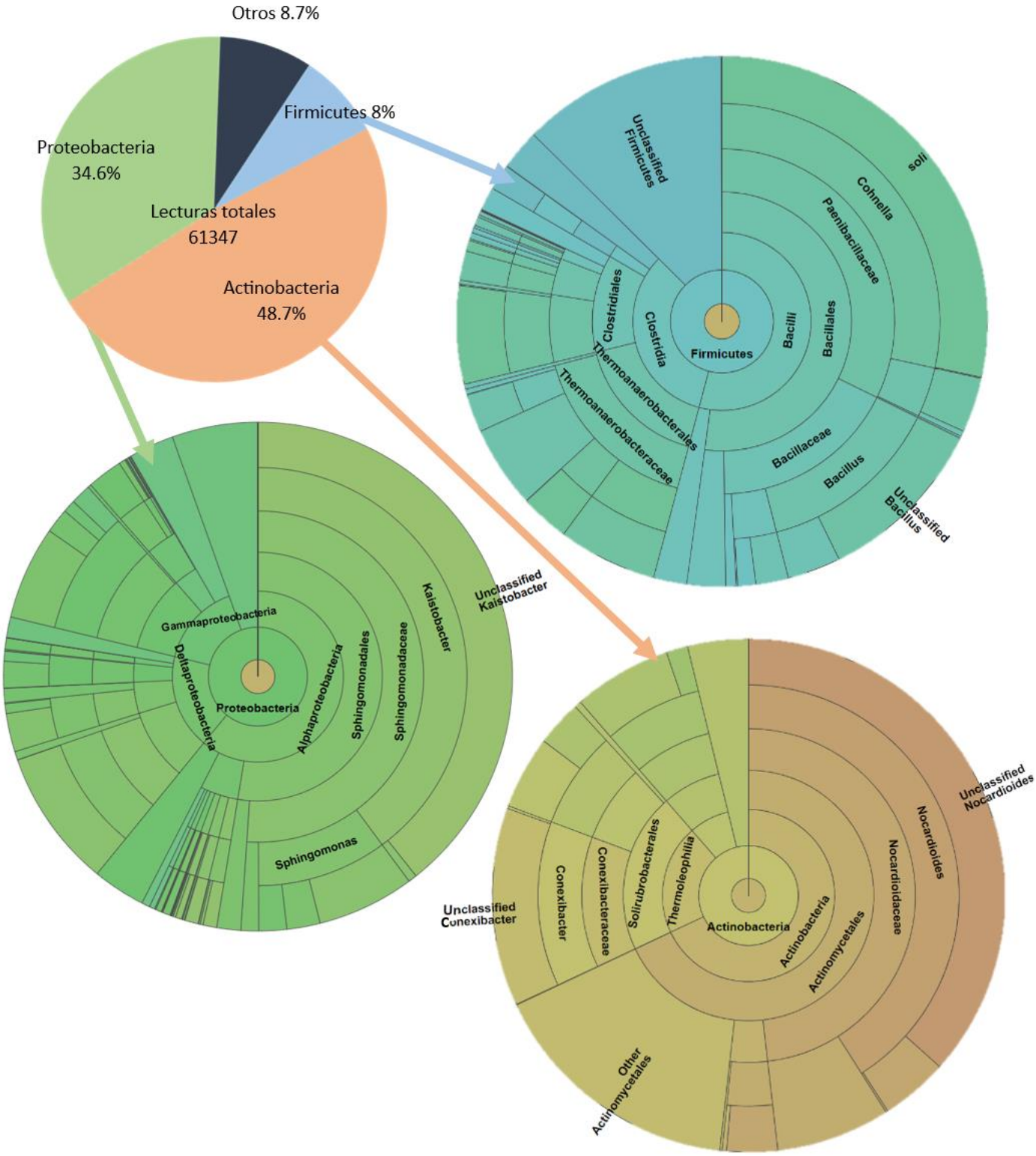


Ilustración de los filos más abundantes detectados en el agua. Elaboración propia

La composición bacteriana identificada en esta muestra es consistente con lo que se espera en suelos no alterados, donde *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* suelen ser los grupos predominantes. Esta distribución refleja la capacidad de *Proteobacteria* (Janssen Peter 2006, Spain et al. 2009) para adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales, el papel fundamental de *Actinobacteria* en la degradación de residuos orgánicos y la síntesis de compuestos bioactivos (Spain et al. 2009), y la afinidad de Firmicutes por ambientes ricos en materia orgánica o con baja disponibilidad de oxígeno (Zhang and Xu 2008, Hugenholtz et al. 1998, Wang et al. 2020a).

En el caso de *Actinobacteria*, la mayoría de los organismos pertenecieron al orden *Actinomycetales* (68.0%), ampliamente distribuido en suelos por su diversidad funcional (Zhang and Xu 2008, Hugenholtz et al. 1998, Zhang et al. 2018b, Blain et al. 2017). Dentro de las *Proteobacteria*, el grupo dominante fue *Alphaproteobacteria* (60.9%), con clara prevalencia del orden *Sphingomonadales* (86.4%) seguido por *Deltaproteobacteria* (17.9%), principalmente del orden *Myxococcales* (52.2%) y *Gammaproteobacteria* (15.8%), en la que destacó el órden *Pseudomonadales* (62.2%). En cuanto a los *Firmicutes*, se identificaron principalmente las clases *Bacilli* (54.2%) y *Clostridia* (33.3%).

7.1.7.4 Efecto de los productos naturales en las comunidades bacterianas acuáticas y terrestres: AWCD y CLPP

Los gráficos superiores en la Figura 43 y Fig. 44 muestran el efecto de la HQ y del TER empleados sobre los microorganismos del río (a1) y del suelo (b1) a lo largo de los 6 días del ensayo, medido como AWCD en comparación con el control (línea negra). En todos los casos estudiados se observa una clara relación dosis-respuesta, donde el aumento en la concentración de los productos naturales genera una inhibición progresiva en el crecimiento bacteriano.

En el caso de la HQ, si bien nuestros resultados indican una alta toxicidad del HQ en varios indicadores acuáticos y terrestres, es sorprendente cómo el impacto en el crecimiento y la capacidad metabólica de estas comunidades microbianas parece estar amortiguado, como si estas comunidades pudieran resistir eficazmente los efectos tóxicos de la HQ. En el caso del TER se observa una toxicidad ligeramente superior a la de la HQ, especialmente en los ensayos realizados a altas concentraciones de producto natural (100 µg/mL). Aunque las gráficas muestran algunas diferencias, estas no

resultaron estadísticamente significativas en comparación con el control, independientemente del compuesto o la concentración analizada.

Los valores de Lc_{50} se calcularon a las 120 horas, momento en el cual la cinética de crecimiento alcanzó la fase estacionaria (Tabla 23). En este punto, el TER presentó valores de Lc_{50} mayores que la HQ, lo que indica una menor toxicidad aguda relativa. Por otro lado, los parámetros que describen la cinética de las curvas de AWCD para todas las concentraciones (*Cmax* y *r*) se encuentran detallados en la Tabla 24. Los valores de *Cmax* muestran consistentemente que el TER reduce el nivel máximo de actividad metabólica comunitaria en mayor medida que la HQ, sugiriendo un efecto más marcado sobre la abundancia final. En cambio, la tasa de crecimiento (*r*) no difirió de manera relevante respecto del control, lo que sugiere que el efecto principal del TER no recae sobre la velocidad inicial de crecimiento sino sobre la capacidad de alcanzar el máximo. Así, la HQ provoca una inhibición aguda más intensa (LC_{50} menor), mientras que el TER ejerce un efecto subletal sostenido que limita el máximo alcanzable (*Cmax* más bajo) sin afectar de forma apreciable la tasa (*r*).

Seguidamente, las Fig. 43 y Fig. 44 (a2–a4) representan el efecto de los productos naturales probados en la capacidad metabólica de los microorganismos del río, medida mediante la utilización de los cinco grupos de sustratos de Biolog EcoPlates™. Los datos se expresan como la diferencia con respecto al control (cuyo valor se fija en 0 en el eje x), permitiendo visualizar cómo varía la eficiencia en la metabolización de distintos compuestos en función de la concentración de los antibióticos.

Al igual que en el caso de los antibióticos investigados en el Bloque I, se observa una tendencia clara en la que el impacto en la actividad metabólica es dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración del producto natural, menor es la capacidad de los microorganismos para metabolizar los distintos sustratos. En particular, HQ redujo significativamente la metabolización de polímeros a la mayor concentración probada ($p = 0.02$), mientras que la presencia de TER no produjo cambios significativos en el metabolismo de la comunidad acuática incluso a altas dosis.

Por otro lado, las Fig. 43 y Fig. 44 (b1) muestran el impacto de la HQ y del TER en la actividad microbiana del suelo a lo largo de los siete días del ensayo, medido mediante la AWCD. Al igual que en los microorganismos acuáticos, se observó un claro

efecto dosis-dependiente, en el cual la inhibición del crecimiento microbiano aumentó conforme se incrementó la concentración de los productos naturales.

A concentraciones bajas (0.1 µg/mL), no se observaron diferencias significativas en el crecimiento microbiano en comparación con el control ($p > 0.05$), lo que sugiere que, a estas dosis, la comunidad microbiana del suelo pudo tolerar la presencia de ambos productos naturales sin una alteración marcada en su actividad. Sin embargo, a partir de 10 µg/mL en el caso del TER y de 100 µg/mL, en el caso de la HQ aparecieron efectos adversos significativos en el crecimiento bacteriano ($p < 0.05$).

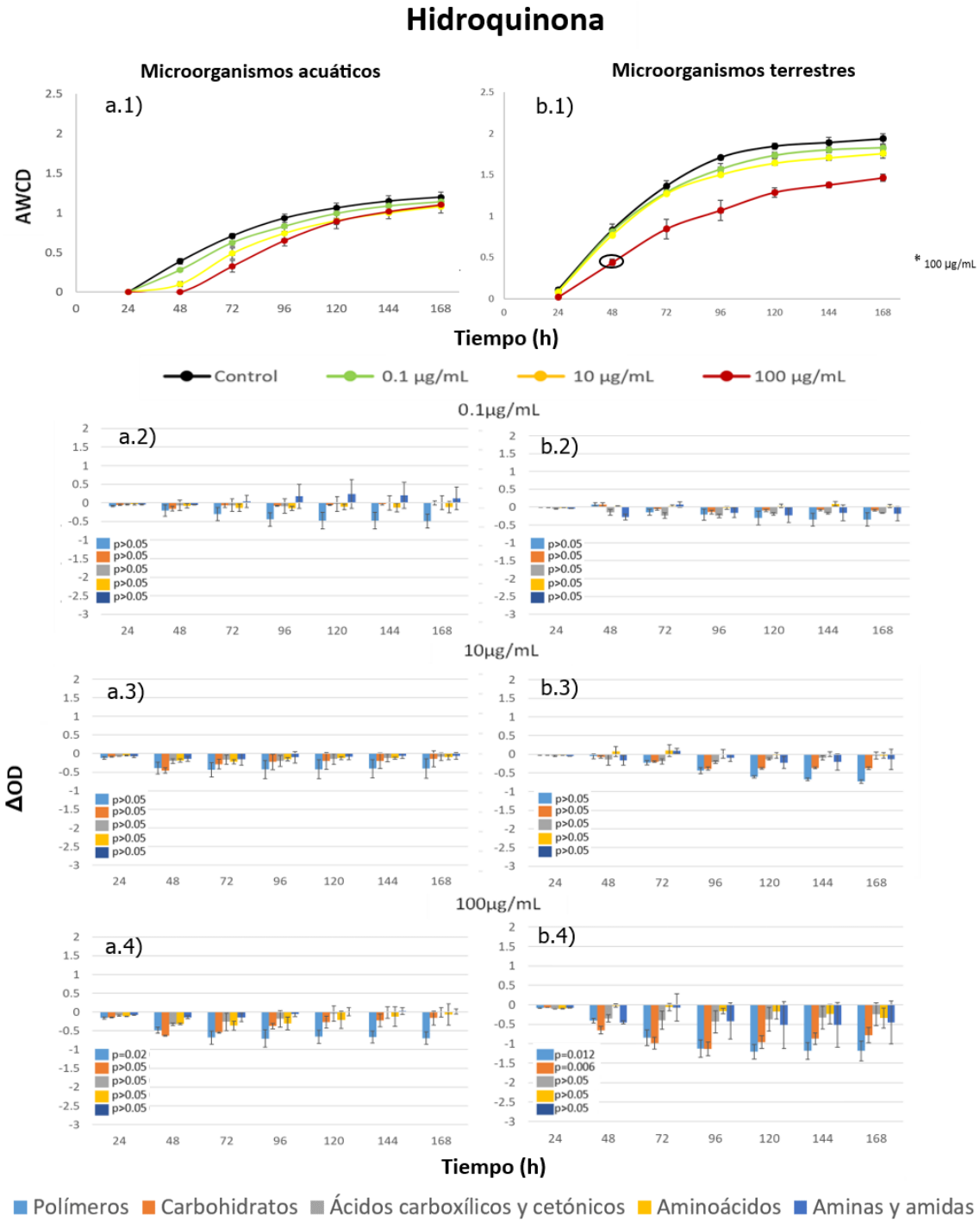
Los valores de Lc_{50} se calcularon al igual que en caso de las comunidades bacterianas acuáticas a las 168 horas, cuando la cinética de crecimiento alcanzó la fase estacionaria (Tabla 23). Por otro lado, los parámetros *Cmax y r*, que describen la cinética de las curvas de AWCD, están disponibles en la Tabla 24. En este caso el TER mostró una ligeramente mayor toxicidad que la HQ.

Por último, las Fig. 43 y Fig. 44 (b2–b4) representan el efecto de ambos productos naturales en la capacidad de los microorganismos del suelo para metabolizar distintos compuestos, evaluado mediante la utilización de los cinco grupos de sustratos de Biolog EcoPlates™. La comparación con el control (fijado en 0 en el eje x) permite visualizar la magnitud del impacto sobre la actividad metabólica.

En el caso de la HQ los efectos se hicieron significativos en el metabolismo de polímeros ($p=0.012$) y de carbohidratos ($p=0.006$) al exponer a la comunidad a una concentración de 100µg/mL. a nivel metabólico, la concentración de 100 µg/mL induce una disminución significativa en la capacidad de metabolizar no solo polímeros ($p=0.012$), como se observó en el caso de las comunidades microbianas de los ríos, sino también carbohidratos ($p=0.006$). No obstante, a concentraciones más bajas, no se observan cambios significativos en el perfil metabólico ($p>0.05$) para ningún metabolito.

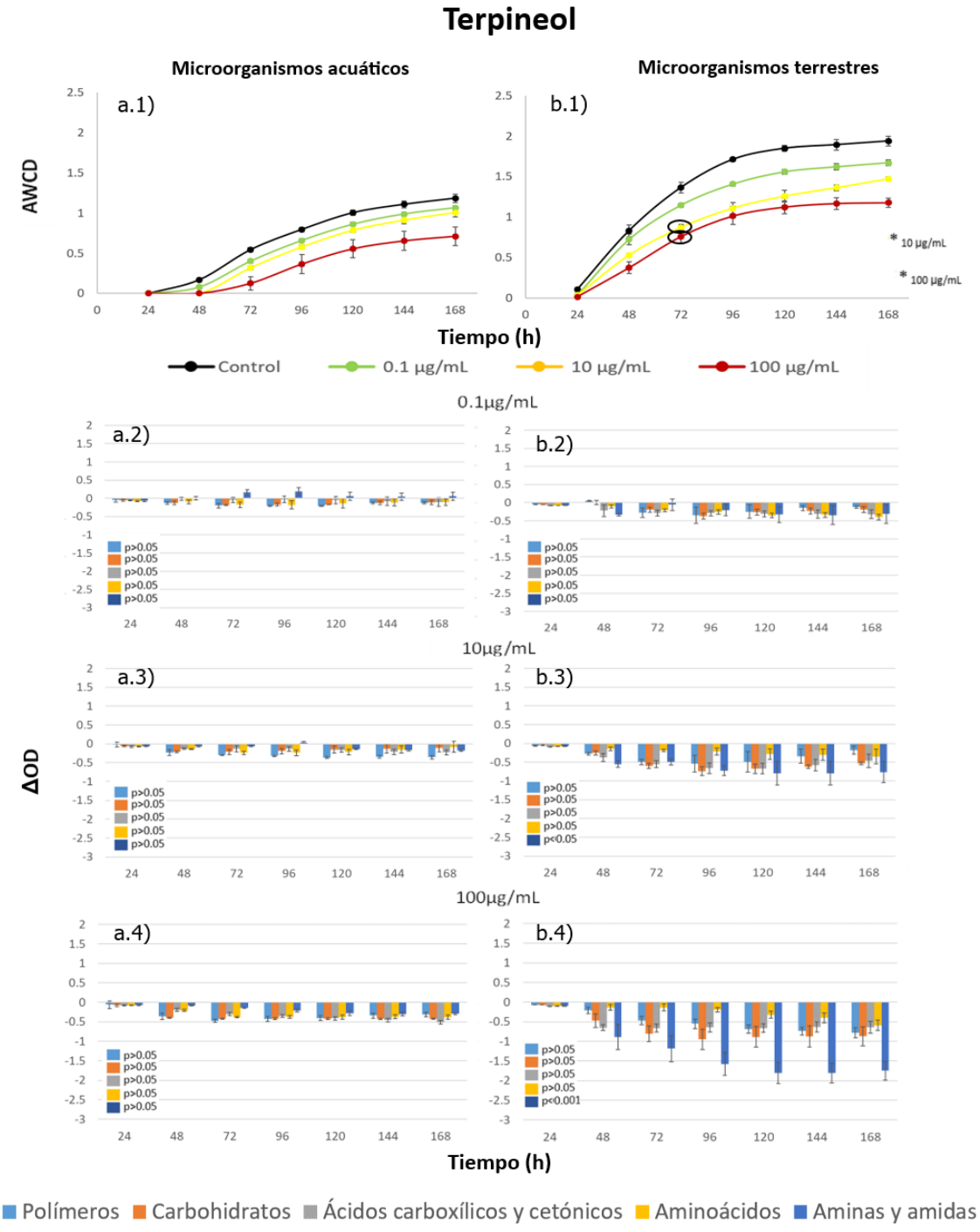
En el caso del TER, se observaron efectos significativos únicamente sobre el metabolismo de los polímeros a la concentración más alta evaluada 100 µg/mL ($p=0.001$). En contraste, a concentraciones más bajas no se detectaron cambios significativos en el metabolismo de ninguno de los compuestos analizados ($p>0.05$), lo que sugiere una posible acción dependiente de la dosis exclusivamente en los polímeros.

Figura 43: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Hidroquinona



*Crecimiento microbiano cuantificado como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés) en placas Biolog EcoPlates, basado en una incubación de 168 horas de microorganismos de (a.1) río y (b.1) suelo expuestos a hidroquinona. El círculo que rodea un punto en las curvas de AWCD indica el momento en que las diferencias con respecto al control se vuelven significativas. Los asteriscos indican el grado de significancia: *p < 0.05 y **p < 0.01. Las barras representan la diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono de los microorganismos de (a.2 a a.4) río y (b.2 a b.4) suelo expuestos a diferentes concentraciones de hidroquinona con respecto al control (eje O), medido como densidad óptica (ΔOD). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas. Elaboración propia.*

Figura 44: Crecimiento de bacterias de agua y suelo tras la exposición a distintas concentraciones de Terpineol



*Crecimiento microbiano cuantificado como el Desarrollo Promedio del Color del Pozo (AWCD, por sus siglas en inglés) en placas Biolog EcoPlates, basado en una incubación de 168 horas de microorganismos de (a.1) río y (b.1) suelo expuestos a hidroquinona. El círculo que rodea un punto en las curvas de AWCD indica el momento en que las diferencias con respecto al control se vuelven significativas. Los asteriscos indican el grado de significancia: *p < 0.05 y **p < 0.01. Las barras representan la diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono de los microorganismos de (a.2 a a.4) río y (b.2 a b.4) suelo expuestos a diferentes concentraciones de hidroquinona con respecto al control (eje O), medido como densidad óptica (ΔOD). Cada punto representa el valor promedio de tres réplicas. Elaboración propia.*

Tabla 24: Parámetros cinéticos (Cmax y r) de las curvas de AWCD de microorganismos de río y suelo expuestos a los productos naturales evaluados.

	Comunidades microbianas acuáticas					Comunidades microbianas terrestres			
	Control	**HQ 0.1 (µg/mL)**	**HQ 10 (µg/mL)**	**HQ 100 (µg/mL)**		**Control**	**HQ 0.1 (µg/mL)**	**HQ 10 (µg/mL)**	**HQ 100 (µg/mL)**
Cmax	1.15	1.11	1.03	1.07		1.89	1.78	1.69	1.41
r	0.05	0.05	0.06	0.06		0.06	0.06	0.06	0.05
	Control	**TER 0.1 (µg/mL)**	**TER 10 (µg/mL)**	**TER 100 (µg/mL)**		**Control**	**TER 0.1 (µg/mL)**	**TER 10 (µg/mL)**	**TER 100 (µg/mL)**
Cmax	1.15	1.05	1.02	0.73		1.89	1.61	1.40	1.16
r	0.05	0.05	0.05	0.06		0.06	0.06	0.05	0.06

Elaboración propia

La evaluación del efecto de la HQ y el TER sobre comunidades bacterianas acuáticas y terrestres revela patrones similares de tolerancia microbiana, a pesar de las diferencias estructurales y funcionales entre ambos compuestos.

La baja toxicidad de la HQ y el TER detectada en las comunidades bacterianas acuáticas puede deberse a la presencia de ciertos microrganismos que posean mecanismos capaces de degradar ambos compuestos. Estos microorganismos podrían presentar ventajas competitivas frente a otros miembros de la comunidad, lo que favorecería una reorganización de las interacciones ecológicas y la eventual formación de una flora dominante especializada en la degradación de HQ y TER, como se ha demostrado en estudios previos (Zhang et al. 2018a, Zhao et al. 2016, Malecky, Albarello and Broudiscou 2012). Tal como se aprecia en las Figuras 43a1 y 44a1, el crecimiento de las comunidades bacterianas expuestas a ambos compuestos no mostró diferencias significativas respecto al control. En el caso de la HQ, los valores fueron prácticamente coincidentes, lo que sugiere que podrían estar ocurriendo reajustes internos dentro de la comunidad microbiana.

Aunque la exposición a HQ no modificó el crecimiento poblacional total, se ha documentado que concentraciones de HQ de hasta 100 mg/L en plantas de tratamiento de aguas residuales condujeron al establecimiento de comunidades microbianas estables, dominadas por los mismos taxones detectados en este estudio: *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (Battistuzzi and Hedges 2009). Estos taxones han demostrado en investigaciones previas que tras la exposición a HQ se producen variaciones en sus proporciones. Específicamente, la abundancia de *Cyanobacteria* permaneció en gran medida inalterada, *Bacteroidetes* mostró un ligero aumento y *Proteobacteria* exhibió una pequeña disminución (Zhang et al. 2022c). El bajo impacto limitado sobre *Cyanobacteria*, que constituyen casi la mitad de las muestras empleadas en esta tesis doctoral, podría explicar los escasos cambios metabólicos observados en nuestro estudio, incluso a la concentración más alta.

Dentro de *Proteobacteria*, aparecen varios miembros de este grupo presentes en nuestras muestras que han sido previamente reportados como capaces de metabolizar HQ (Ansola, Arroyo and Sáenz de Miera 2014): destacan los órdenes *Pseudomonadales* (específicamente del género *Pseudomonas*) y miembros de la familia *Moraxellaceae*, ambos reconocidos por su capacidad de utilizar y degradar HQ (Narciso-da-Rocha and Manaia 2016, Zhang et al. 2012, Rios-Miguel et al. 2022, Park and Oh 2020). Además, dentro de *Betaproteobacteria*, observamos la presencia de *Burkholderiales*, también capaces de seguir rutas de degradación de HQ (Marchlewicz, Guzik and Wojcieszyńska 2015). Por otro lado, *Bacteroidetes* son conocidos por su capacidad para degradar diversos compuestos de carbono complejos, incluido HQ (Traversi et al. 2012), lo que podría explicar su incremento relativo como una forma de compensación por la reducción de *Proteobacteria*.

En términos de función metabólica, solo se detectó una disminución significativa en la capacidad de metabolizar polímeros a la mayor concentración probada de HQ (100 µg/mL; $p = 0.02$). El resto de los cambios en el perfil funcional no resultaron estadísticamente significativos en ninguna de las concentraciones ensayadas. Estos resultados concuerdan con investigaciones que indican la conservación de genes funcionales para el metabolismo de carbohidratos y energía tras la exposición a HQ (Zhang et al. 2022c).

Por lo tanto, aunque la presencia de HQ puede haber inducido inicialmente estrés en la comunidad microbiana, posiblemente estimulando la producción de metabolitos

secundarios tóxicos (Zhang et al. 2022c, Chen et al. 2022), con el tiempo se observa una sucesión ecológica que culmina en el establecimiento de una flora dominante capaz de tolerar o degradar este compuesto. Esto permite mantener estable la capacidad metabólica global de la comunidad, lo que sugiere que el impacto ambiental de HQ en cuerpos de agua podría ser limitado.

De forma análoga a lo observado con la HQ, el TER también puede ser utilizado como fuente de carbono y energía por varios taxones del filo *Proteobacteria*. En particular, miembros del género *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) han sido ampliamente estudiados por su capacidad de metabolizar compuestos aromáticos como el TER (Madyastha and Renganathan 1984). Asimismo, dentro de *Betaproteobacteria*, se ha identificado a *Burkholderiales* como un grupo con potencial para degradar este compuesto, tal como se ha documentado en estudios sobre biorremediación y tratamiento de residuos industriales (Marmulla and Harder 2014, Madyastha and Renganathan 1984).

En entornos naturales, muchos otros microorganismos aerobios podrían metabolizar el TER a bajas concentraciones, dado que los monoterpenos son compuestos orgánicos biodegradables presentes en la materia vegetal. Por otro lado, en condiciones anaerobias, la degradación de estos compuestos es más limitada; aun así, se ha observado que algunos monoterpenos pueden eventualmente fermentarse o transformarse bajo anaerobiosis, aunque con acumulación de metabolitos intermedios y tiempos más prolongados (Malecky et al. 2012).

En conjunto, estos hallazgos indican que el TER es susceptible de biodegradación por comunidades microbianas acuáticas. Estudios previos han demostrado que su degradación no se ve impedida por la presencia de otras fuentes de carbono ya que la adición de materia orgánica disuelta natural no alteró significativamente ni la velocidad ni la extensión de la biodegradación de TER en condiciones aeróbicas (Trujillo-Reyes et al. 2024). Sin embargo, a concentraciones elevadas, el TER puede ejercer un efecto inhibitorio sobre parte de la comunidad microbiana, lo que retrasa la mineralización de la materia orgánica total. Esto ha sido observado en tratamientos de aguas residuales industriales con altos niveles de este compuesto (1000µg/mL), como en efluentes de molinos de pulpa de madera o industrias cítricas (Trujillo-Reyes et al. 2024).

En este contexto, aunque el TER puede inducir alteraciones en el perfil metabólico de las comunidades microbianas acuáticas, estos efectos solo se manifiestan a concentraciones más elevadas que las empleadas en el presente estudio. Esto explicaría la ausencia de modificaciones metabólicas detectadas en las condiciones experimentales utilizadas expuestas en la figura 44a2-4.

Por otro lado, como se puede observar en la figura 43b1, las comunidades microbianas terrestres también parecen tolerar bien la exposición a HQ, excepto a concentraciones superiores a 100 µg/mL ($p = 0.05$). En este caso, no se observa un descenso inicial en el crecimiento seguido de una recuperación posterior, como se vio en los microorganismos de los ríos. En su lugar, a 100 µg/mL, el crecimiento se inhibe parcialmente desde el inicio de la exposición a HQ. Esta mayor sensibilidad de las comunidades microbianas del suelo en comparación con las acuáticas es consistente con hallazgos de otros estudios, donde los microorganismos del suelo o sedimentos parecen ser más vulnerables a compuestos potencialmente tóxicos que los microorganismos acuáticos (Zhang et al. 2016, Feng et al. 2018).

Existen muy pocos estudios que han examinado el efecto del HQ en comunidades microbianas del suelo. Sin embargo, hay evidencia de que HQ puede afectar el crecimiento microbiano. Estudios previos han reportado que los suelos enmendados con HQ experimentan una disminución en el crecimiento de poblaciones microbianas cultivables, siendo la HQ el dihidroxibenceno más tóxico en comparación con otros compuestos fenólicos como el resorcinol y el catecol (Chen et al. 2009). También se ha documentado que la exposición de microorganismos del suelo puede inducir cambios menores, como un aumento en la abundancia relativa de grupos involucrados en la fermentación y la celulólisis (Li et al. 2019), lo que podría explicar las ligeras variaciones en el perfil metabólico detectado en este estudio.

El uso de la HQ como inhibidor de la ureasa en fertilizantes nitrogenados (Candido et al. 2023) para evitar la descomposición de la urea y aumentar la disponibilidad de NH_3/NH_4^+ para la absorción por las plantas (Chien, Prochnow and Cantarella 2009) ha limitado el número de estudios sobre el efecto del HQ en los microorganismos del suelo, especialmente en los procesos de nitrificación y desnitrificación, con resultados variables. Algunos estudios concuerdan con nuestros hallazgos al señalar que HQ induce cambios mínimos en la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo, con escaso impacto sobre grupos implicados en la

ureólisis (Li et al. 2019, Bremner and Chai 1989). Sin embargo, otros autores han informado que la HQ puede inhibir a los microorganismos oxidadores de amonio (Dong et al. 2018) o retrasar la hidrólisis de urea, afectando indirectamente los procesos de nitrificación y desnitrificación (Zaman et al. 2008). Pese a esto, los estudios a largo plazo sobre el efecto del HQ en estas rutas metabólicas siguen siendo limitados. Los resultados obtenidos en la presente investigación, sin embargo, no indican cambios significativos en la capacidad para metabolizar sustratos potencialmente involucrados en el metabolismo del nitrógeno, como ácidos carboxílicos y cetónicos, aminoácidos o aminas y amidas.

La tolerancia observada en las comunidades microbianas del suelo a concentraciones de HQ inferiores a 100 µg/mL podría explicarse por mecanismos similares a los descritos para las comunidades acuáticas. En este escenario, también encontramos una gran diversidad de grupos taxonómicos, por lo que la sustitución de especies sensibles por otras más resistentes, capaces de degradar HQ, es un proceso esperable. (Narciso-da-Rocha and Manaia 2016, Castrejón-Godínez et al. 2022, Jia 2009, Flood Jake and Copley Shelley 2018).

Otros mecanismos de resistencia también podrían estar involucrados, como la producción de enzimas específicas para la detoxificación de compuestos fenólicos, descritas en miembros del orden *Actinomycetales*, que representan el 32.94% de las secuencias en nuestras muestras (Jain, Dreisbach and Spain 1994), Además, la formación de biofilms, observada en familias como *Corynebacteriaceae*, también dentro de *Actinomycetales*, se ha asociado con la capacidad de metabolizar HQ (Čejková et al. 2005), también son plausibles. De hecho, la diversidad microbiana, la estructura y la función de un biofilm le confieren una alta capacidad metabólica. Se ha reportado que los biofilms son capaces de eliminar más del 95% de los compuestos fenólicos, incluido la HQ (Tian et al. 2020).

En el caso del TER, como se observa en la Figura 44b1, las comunidades bacterianas del suelo mostraron una menor tolerancia frente a este compuesto, con diferencias significativas en el crecimiento respecto al control a concentraciones superiores a 10 µg/mL ($p = 0.05$). Esta mayor sensibilidad de las comunidades microbianas del suelo en comparación con las acuáticas es consistente con hallazgos de otros estudios, observación también se ha reportado en productos o extractos de origen vegetal (Pino-Otín et al. 2021, Pino-Otín et al. 2022b).

La fumigación experimental de suelos agrícolas con TER también ha mostrado impactos notables en la estructura microbiana del suelo. Por ejemplo ,se ha reportado una marcada disminución en la abundancia relativa del filo *Ascomycota* que incluye numerosos hongos fitopatógenos, reduciéndose del 64 % al 32 %, junto con un enriquecimiento de bacterias pertenecientes a los filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* (Ye et al. 2021). Cambios similares se han observado en suelos asociados a especies vegetales que liberan monoterpenos. Un ejemplo destacado es *Melaleuca alternifolia* (árbol del té), cuyo quimiotipo rico en TER ha mostrado influir en el microbioma del suelo. En experimentos con plántulas cultivadas in vitro, la rizósfera de plantas con alto contenido de terpineol presentó un incremento de bacterias beneficiosas como *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, fijadoras de nitrógeno, junto con una reducción en hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium* y *Colletotrichum* (Tian et al. 2025).

A diferencia de la HQ, el TER no se utiliza comúnmente como inhibidor bioquímico en suelos agrícolas, lo que ha limitado los estudios sobre su efecto en procesos clave como la nitrificación y la desnitrificación. Sin embargo, algunos resultados disponibles indican que los monoterpenos como el TER pueden inhibir la nitrificación, afectando el ciclo del nitrógeno (Amaral et al. 1998). En nuestro estudio, esta interferencia podría estar relacionada con la alteración observada en el metabolismo de compuestos nitrogenados, como aminas y amidas, que desempeñan un papel esencial en dicho ciclo.

Por analogía con estudios realizados con otros monoterpenos fenólicos como timol y carvacrol, se ha observado que, a concentraciones elevadas (100 mg/L), estos compuestos reducen significativamente la utilización de diversos sustratos carbonados por la microbiota del suelo. En particular, se ha documentado una disminución notable en la utilización de compuestos nitrogenados, como aminas y amidas, por comunidades edáficas expuestas a estos terpenos, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en la presente investigación (Gan et al. 2024).

Posiblemente, algunos de estos efectos se vean minimizados por la biodiversidad microbiana y su correspondiente diversidad metabólica de la microbiota que hemos identificado en la muestra de suelo. Efectivamente, varios estudios han demostrado que ciertas bacterias aerobias presentes en suelos forestales son capaces de biodegradar rápidamente el α-terpineol. En condiciones de laboratorio, se ha observado una degradación casi completa de este compuesto bajo condiciones aerobias, acompañada de un aumento en la biomasa microbiana y la producción de CO_2 (Misra et al. 1996).

Asimismo, se han aislado cepas de *Pseudomonas* afines (por ejemplo, *Pseudomonas nitroreducens*) que utilizan α-terpineol como fuente de carbono, proceso que implica la participación de enzimas como el citocromo P450, responsables de su oxidación inicial (Wong et al. 2018).

7.4 BLOQUE IV: Actividad antimicrobiana de los productos naturales en combinación con antibióticos

Los resultados obtenidos en el bloque anterior demostraron que, aunque tanto la HQ como el TER presentan una destacada actividad antimicrobiana, sus perfiles ecotoxicológicos difieren notablemente. En particular, la HQ mostró una toxicidad ambiental significativamente más elevada, incluso a concentraciones inferiores a las requeridas para observar efectos equivalentes con el TER. **Esta diferencia fue determinante para la selección del TER como compuesto natural de referencia en las siguientes fases experimentales, ya que su mayor margen de seguridad ecológica, junto con su eficacia antimicrobiana, lo convierten en la opción más adecuada para ser evaluada en combinación con antibióticos comerciales.**

Tras haber presentado en el bloque II los resultados correspondientes a la evaluación de la actividad antimicrobiana del TER en condiciones de exposición individual, el presente bloque IV se centra en la segunda parte del estudio, enfocada en el análisis de los efectos derivados de su combinación con antibióticos sintéticos representativos de distintas clases farmacológica a fin de evaluar si su combinación potencia la actividad antimicrobiana y reduce la probabilidad de aparición de resistencias bacterianas. Con este enfoque metodológico se pretende investigar la naturaleza de las interacciones entre el compuesto natural y los antibióticos, así como su impacto potencial en la selección y propagación de resistencias bacterianas.

Con ello, se da cumplimiento al cuarto objetivo específico de esta tesis doctoral:

OBJETIVO IV: "Identificar y caracterizar las posibles sinergias entre compuestos naturales con baja toxicidad ambiental y antibióticos comerciales, así como su impacto sobre la aparición de resistencias microbianas"

Los resultados presentados en este bloque han sido recogidos también en el artículo citado en el Bloque II:

Pino-Otín, M., Valenzuela, A., Gan, C., Ferrando, N., Langa, E., Ballestero, D. Terpineol Enhances Antibiotic Effectiveness and Reduces Resistance in Clinically Relevant Bacteria. HELIYON (Q1, Factor de Impacto: 2.9)

Los resultados de este artículo se encuentran presentados en su totalidad en el **Anexo 2.1**

7.4.1 Resumen

En una primera fase del estudio, el diseño experimental se orientó a explorar de manera sistemática la interacción entre el compuesto de origen natural TER y una selección de antibióticos representativos de diferentes clases terapéuticas, empleados tanto en la medicina humana como en la práctica veterinaria. El propósito principal fue caracterizar el comportamiento combinado de estas sustancias en términos de eficacia antimicrobiana, evaluando si la acción conjunta generaba efectos potenciadores (sinérgicos), simplemente acumulativos (aditivos) o, por el contrario, interferencias negativas (antagónicos). Para ello, se implementaron ensayos estandarizados de sensibilidad bacteriana, acompañados de un análisis cuantitativo comparativo de las respuestas obtenidas frente a cada tratamiento individual y combinado. Esta estrategia permitió establecer perfiles de interacción precisos y seleccionar aquellas combinaciones en las que el efecto observado superaba significativamente al de cada uno de los compuestos administrados por separado.

Una vez identificadas las combinaciones con efectos sinérgicos más prometedores, se procedió a su análisis en profundidad, estructurado en torno a dos ejes principales. En primer lugar, se evaluó cuantitativamente su impacto sobre las tasas de crecimiento bacteriano, con el fin de determinar la magnitud del efecto inhibitorio frente a cepas sensibles en condiciones controladas. Esta evaluación permitió establecer diferencias significativas entre tratamientos individuales y combinados, aportando evidencia sólida sobre la mejora de la eficacia antimicrobiana al incorporar el TER.

Finalmente, se analizó la influencia de estas combinaciones sobre la dinámica de aparición y selección de cepas resistentes, mediante ensayos prolongados que simulan condiciones de exposición repetida. Este aspecto adquiere especial relevancia en el contexto actual, donde la proliferación de resistencias antimicrobianas representa una

amenaza crítica para la salud pública global, comprometiendo la efectividad de los tratamientos convencionales y dificultando el control de infecciones tanto en entornos clínicos como comunitarios. El enfoque adoptado en esta etapa no solo permite valorar el potencial terapéutico de las combinaciones seleccionadas, sino que también ofrece una perspectiva preventiva, orientada a reducir la presión selectiva asociada al uso indiscriminado de antibióticos.

Los ensayos fueron realizados exclusivamente con el compuesto TER, seleccionado entre los productos naturales estudiados debido a su destacada actividad antimicrobiana y su bajo perfil de toxicidad ambiental como se ha comentado previamente. Estas propiedades lo posicionan como una alternativa prometedora para su uso en combinación con agentes antimicrobianos sintéticos. En esta fase del estudio, el TER fue expuesto junto con una selección de antibióticos que, en etapas previas, habían demostrado una eficacia intermedia frente a las cepas bacterianas ensayadas, con MICs comprendidas entre 0.0156 y 0.5 mg/mL, tal como se recoge en la Tabla 21. Esta elección estratégica permitió explorar el potencial del TER para mejorar el rendimiento de antibióticos cuya efectividad individual se encuentra en niveles moderados, evaluando así su capacidad de actuación como modulador sinérgico.

El desarrollo de este estudio no solo permitió identificar aquellas combinaciones en las que se observó una potenciación significativa de la actividad antimicrobiana respecto a los compuestos administrados de forma individual, sino que también posibilitó detectar formulaciones que presentaron un perfil favorable en términos de presión selectiva. En particular, se identificaron combinaciones que, además de mejorar la eficacia frente a bacterias sensibles, mostraron una capacidad notable para reducir la aparición de cepas resistentes, limitando la frecuencia de eventos adaptativos en las poblaciones microbianas expuestas. Este doble beneficio refuerza el interés de explorar estrategias terapéuticas combinadas que incluyan productos naturales como el TER, orientadas no solo a optimizar los resultados clínicos, sino también a preservar la eficacia a largo plazo de los antibióticos convencionales.

El valor añadido de este bloque radica en la identificación de combinaciones novedosas entre el TER y antibióticos sintéticos, cuya interacción no había sido previamente explorada en la literatura científica. Estos hallazgos no solo amplían el conocimiento existente sobre las propiedades del TER, sino que le confieren una nueva funcionalidad potencial como agente coadyuvante en terapias antimicrobianas. La

capacidad del TER para potenciar la eficacia de determinados antibióticos y, en algunos casos, contribuir a la reducción de la aparición de resistencias bacterianas, posiciona a este compuesto como un candidato estratégico en el diseño de tratamientos combinados más efectivos.

Asimismo, los resultados obtenidos en este bloque constituyen la base fundamental para el desarrollo del último apartado experimental de la presente tesis doctoral. Una vez seleccionadas las combinaciones más prometedoras desde el punto de vista terapéutico, se plantea como siguiente paso la evaluación de su impacto ambiental, con el objetivo de determinar su viabilidad como alternativas sostenibles. Esta fase final permite integrar la dimensión ecológica al análisis de eficacia terapéutica y avanzar hacia un modelo de farmacoterapia ambientalmente responsable, en el que la efectividad clínica no esté reñida con la protección medioambiental.

7.4.2 Información específica sobre material y métodos

Los experimentos llevados a cabo en este bloque se han realizado siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2.5 para determinar el tipo de interacción entre el TER y los antibióticos y las propiedades cinéticas de las mismas.

Para realizar este análisis, se seleccionó la solución de TER en el disolvente que presentaba el valor más bajo MIC para cada una de las cepas bacterianas. En los casos en los que se obtuvieron múltiples soluciones con el mismo valor de MIC para una misma bacteria, se priorizó el uso de soluciones preparadas en DMSO, debido a su estabilidad y propiedades compatibles con el ensayo. Por otro lado, las soluciones de antibióticos incluidas en el estudio se limitaron exclusivamente a aquellas cuya MIC era superior a 0.01 mg/mL, garantizando así que las combinaciones resultantes tuvieran relevancia clínica y ambiental.

Una vez determinadas las combinaciones que presentaban efectos sinérgicos se han estudiado sus efectos en la generación de resistencias según la metodología descrita en el apartado 6.2.6.

7.4.3 Actividad antimicrobiana de las combinaciones entre terpineol y antibióticos

La Tabla 25 presenta los valores del FICi de las combinaciones de TER con los antibióticos que cumplían los criterios expuestos en el apartado anterior.

Los resultados obtenidos revelan que seis combinaciones exhibieron un efecto sinérgico (FICi ≤ 0.5), 24 mostraron aditividad (0.5 < FICi ≤ 1) y 13 presentaron un comportamiento indiferente (1 < FICi < 4). Es importante destacar que ninguna de las combinaciones evaluadas manifestó antagonismo (FICi ≥ 4), lo que indica que la coadministración de estos compuestos no genera efectos negativos en la actividad antibacteriana de ninguno de los antibióticos probados sobre las cepas bacterianas empleadas.

Las dos últimas columnas de la tabla reflejan el porcentaje de reducción de la MIC en las combinaciones sinérgicas, tanto para los antibióticos empleados como para TER. Estas reducciones evidencian el potencial de estas combinaciones para mejorar la eficacia antibacteriana con menores dosis de cada compuesto, lo que podría reducir la toxicidad ambiental y los efectos adversos en tratamientos clínicos.

Tabla 25: Valores MIC y FICi de las combinaciones de TER y antibióticos

	Antibiótico	MIC antibiótico solo (mg/mL)	MIC terpineol solo (mg/mL)	MIC antibiótico en combinación (mg/mL)	MIC terpineol en combinación (mg/mL)	FICi	Descenso antibiótico (%)	Descenso terpineol (%)
E. faecalis	AMP	0.5	2	0.5	2	2	0.0	0.0
	AMO	0.5	2	0.5	2	2	0.0	0.0
	GTM	0.5	2	0.125	1	0.75	75.0	50.0
	STM	0.125	2	0.0625	0.5	0.75	50.0	75.0
	ERY	0.125	2	0.125	2	2	0.0	0.0
	CHL	0.25	2	0.125	1	1	50.0	50.0
	FF	0.0625	2	0.0312	1	1	50.0	50.0
L. monocytogenes	GTM	0.5	2	0.25	1	1	50.0	50.0
	STM	0.25	2	0.125	1	1	50.0	50.0
	FF	0.0156	2	0.0078	1	1	50.0	50.0
	NMC	0.0625	2	0.0312	1	1	50.0	50.0
S. aureus	GTM	0.0156	0.5	0.0039	0.125	**0.5**	75.0	75.0
	STM	0.0625	0.5	0.0312	0.25	1	50.0	50.0
	FF	0.0312	0.5	0.0078	0.0625	**0.375**	75.0	87.5
	NMC	0.0156	0.5	0.0078	0.25	1	50.0	50.0
S. agalactiae	GTM	0.0156	0.5	0.0039	0.125	**0.5**	75.0	75.0
	STM	0.125	0.5	0.0156	0.25	0.625	87.5	50.0
A. baumannii	PEN	0.5	0.25	0.5	0.25	2	0.0	0.0
	AMP	0.125	0.25	0.125	0.25	2	0.0	0.0
	AMO	0.125	0.25	0.125	0.25	2	0.0	0.0
	GTM	0.0156	0.25	0.0039	0.0625	**0.5**	75.0	75.0
	STM	0.0156	0.25	0.0019	0.125	0.625	87.8	50.0
	CHL	0.0625	0.25	0.0625	0.25	2	0.0	0.0
	AMO	0.125	0.5	0.125	0.5	2	0.0	0.0
	ERY	0.0156	0.5	0.0078	0.25	1	50.0	50.0
	TC	0.0625	0.5	0.0156	0.125	**0.5**	75.0	75.0
	CHL	0.125	0.5	0.0156	0.125	**0.375**	87.5	75.0
	FF	0.0312	0.5	0.0156	0.25	1	50.0	50.0

	Antibiótico	MIC antibiótico solo (mg/mL)	MIC terpineol solo (mg/mL)	MIC antibiótico en combinación (mg/mL)	MIC terpineol en combinación (mg/mL)	FICi	Descenso antibiótico (%)	Descenso terpineol (%)
E. coli	GTM	0.0625	1	0.0156	0.5	0.75	75.0	50.0
	STM	0.0312	1	0.0156	0.5	1	50.0	50.0
	ERY	0.5	1	0.25	0.5	1	50.0	50.0
	FF	0.0625	1	0.0312	0.5	1	50.0	50.0
	NMC	0.0312	1	0.0156	0.5	1	50.0	50.0
K. aerogenes	ERY	0.0625	1	0.0312	0.5	1	50.0	50.0
	FF	0.0312	1	0.0312	1	2	0.0	0.0
	NMC	0.0312	1	0.0312	1	2	0.0	0.0
K. pneumoniae	AMP	0.125	0.5	0.125	0.5	2	0.0	0.0
	AMO	0.25	0.5	0.25	0.5	2	0.0	0.0
	ERY	0.0625	0.5	0.0312	0.25	1	50.0	50.0
***S.* Typhimurium**	AMP	0.0156	0.5	0.0078	0.25	1	50.0	50.0
	AMO	0.0625	0.5	0.0312	0.25	1	50.0	50.0
	ERY	0.0312	0.5	0.0019	0.25	0.562	93.9	50.0
S. marcescens	AMP	0.125	0.5	0.125	0.5	2	0.0	0.0
	AMO	0.125	0.5	0.125	0.5	2	0.0	0.0
	ERY	0.0156	0.5	0.0078	0.25	1	50.0	50.0
	TC	0.0625	0.5	0.0156	0.125	**0.5**	75.0	75.0
	CHL	0.125	0.5	0.0156	0.125	**0.375**	87.5	75.0
	FF	0.0312	0.5	0.0156	0.25	1	50.0	50.0

Los valores resaltados corresponden a las combinaciones sinérgicas
Elaboración propia

A partir de estos hallazgos, las seis combinaciones que mostraron sinergismo fueron seleccionadas para un análisis más detallado. Esta fase de investigación incluyó la construcción de isobologramas, el estudio de la cinética de inhibición bacteriana, y la evaluación mediante los ensayos de letalidad bacteriana para determinar la dinámica de acción de las combinaciones sinérgicas a lo largo del tiempo.

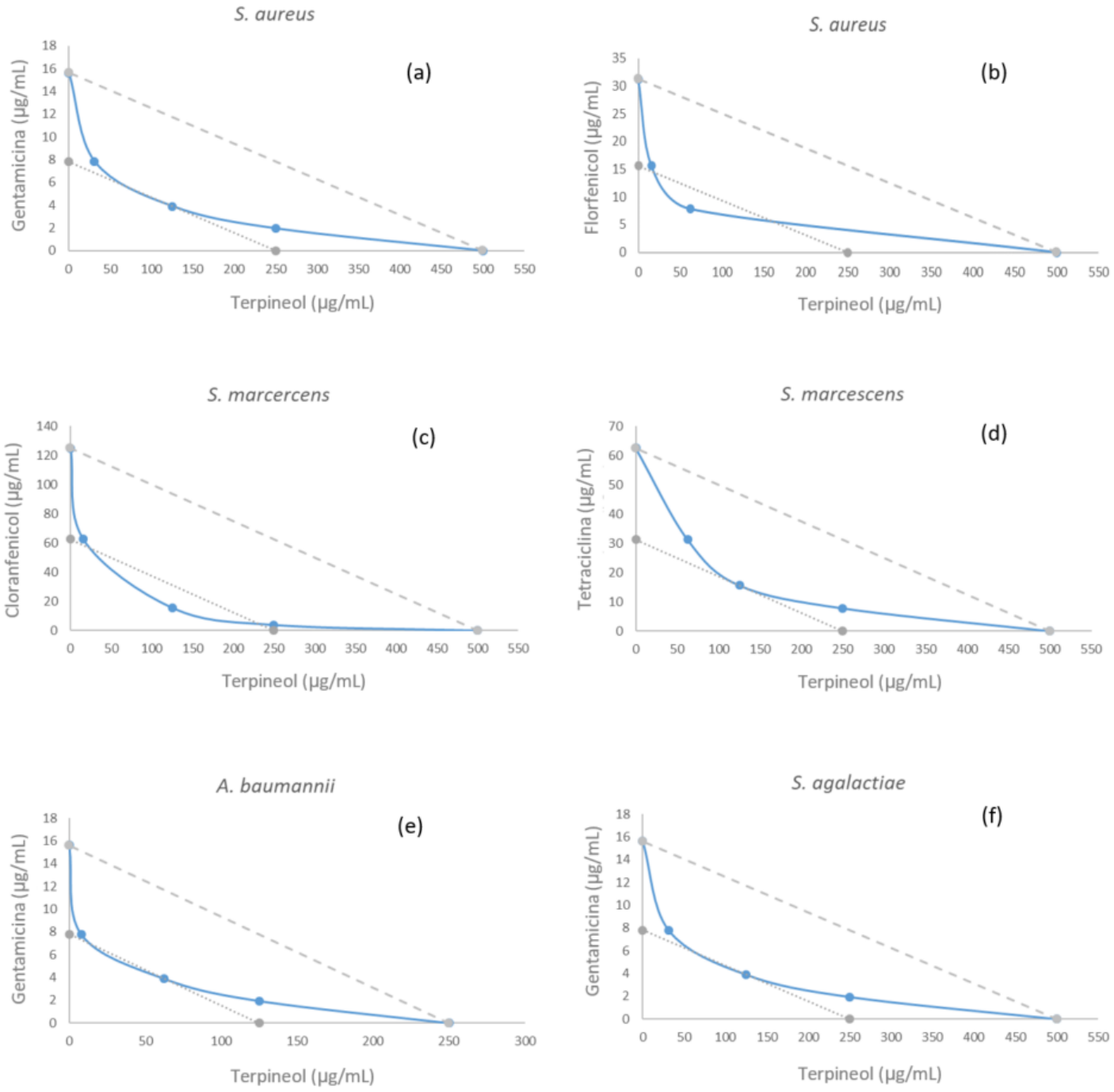
La Figura 45 presenta los isobologramas correspondientes a las seis combinaciones sinérgicas, ofreciendo una representación gráfica detallada de la interacción entre los compuestos evaluados. Estos diagramas permiten visualizar el grado de sinergismo en función de las concentraciones relativas de los antibióticos combinados, facilitando la interpretación de sus efectos sobre la inhibición del crecimiento bacteriano.

En todas las combinaciones analizadas, se observó un único punto con comportamiento sinérgico (≤ 0.5), ubicado por debajo de la línea de puntos inferior, lo que confirma una interacción favorable entre los compuestos, permitiendo alcanzar un efecto antimicrobiano significativo con concentraciones reducidas de cada fármaco.

Por otro lado, las demás concentraciones ensayadas se distribuyeron entre las dos líneas de puntos, reflejando distintos niveles de interacción. Esta distribución sugiere que, aunque las combinaciones continúan mostrando cierto grado de cooperación, la intensidad del efecto sinérgico puede variar según la proporción de los compuestos empleados.

Sin embargo, en ningún caso se detectó un comportamiento antagónico ≥ 4, ya que ningún punto se situó por encima de la línea superior de puntos, donde se esperaría la interferencia mutua entre los compuestos, lo que resultaría en una reducción de su actividad antimicrobiana conjunta.

Figura 45: Isobolobramas de las interacciones sinérgicas entre el terpineol y los antibióticos



Los puntos representan la MIC de las concentraciones en tablero de ajedrez evaluadas de terpineol (eje X) y antibióticos (eje Y). La línea discontinua superior representa el límite de adición y la línea punteada inferior representa el límite de sinergia. Solo los puntos por debajo de la línea punteada inferior cumplen con los criterios para ser considerados sinergias. Elaboración propia

Las Figuras 46a a 51a representan la cinética de las sinergias descubiertas, proporcionando una visión detallada de la evolución temporal de la actividad antimicrobiana en distintas condiciones experimentales.

En cada gráfico se distinguen varios escenarios experimentales, los cuales reflejan tanto el impacto individual de cada compuesto como el efecto sinérgico cuando se combinan en proporciones óptimas. Se incluyen las concentraciones de TER solo a la concentración de la MIC (representada por la línea verde más intensa), permitiendo observar su capacidad inhibitoria cuando se administra individualmente en su concentración mínima inhibitoria. De manera similar, se muestran las concentraciones de cada uno de los antibióticos solos a la concentración de la MIC (línea roja más intensa), proporcionando información sobre su actividad antibacteriana independiente.

Para evaluar el efecto combinado, las figuras también incluyen las concentraciones sinérgicas de TER y el antibiótico en combinación (línea azul), permitiendo identificar si la interacción entre ambos compuestos mejora la eficacia del tratamiento. Adicionalmente, se representan las concentraciones individuales de TER y del antibiótico, pero en las mismas cantidades utilizadas en la sinergia, es decir, TER en la sinergia, pero de forma aislada (línea verde menos intensa) y el antibiótico empleado en la sinergia, pero también de forma aislada (línea roja menos intensa). Estas representaciones permiten evaluar si las concentraciones más bajas utilizadas en la sinergia mantienen algún efecto individual significativo.

Finalmente, la línea negra representa el control de crecimiento, proporcionando una referencia clara para comparar la eficacia de cada tratamiento en la inhibición bacteriana. Esta disposición gráfica permite no solo visualizar el impacto de cada fármaco en solitario y en combinación, sino también detectar diferencias en el tiempo de respuesta y la magnitud del efecto antibacteriano.

Los resultados obtenidos confirman que, como era de esperarse, tanto la concentración de MIC de los antibióticos y TER por separado, como la sinergia entre ambos, conducen a una reducción del 100% del crecimiento bacteriano. Además, también se observó una reducción del crecimiento cuando TER y los antibióticos se emplearon a concentraciones de sinergia por separado, aunque el efecto fue menor. Se observó que todas las diferencias con respecto al control fueron estadísticamente significativas a las 3 o 4 horas, lo que indica que las combinaciones sinérgicas generan

una rápida y efectiva acción antimicrobiana, reduciendo la carga bacteriana en un período de tiempo relativamente corto.

Para complementar estos hallazgos, se presentan en una tabla vinculada a los gráficos los valores de Cmax, r y Tm50, que permiten cuantificar de manera precisa la eficacia y velocidad de la actividad antibacteriana de cada combinación.

El estudio de la cinética de las concentraciones en las que TER y los antibióticos presentan sinergia en cada caso es fundamental, ya que permite visualizar cómo cada compuesto influye de manera individual sobre las bacterias y cómo se combinan sus efectos en términos de inhibición del crecimiento y eliminación bacteriana. Este análisis ha revelado diferencias interesantes en la actividad de cada antibiótico, lo que sugiere que ciertos de ellos pueden tener mecanismos de acción más efectivos cuando se administran en combinación con TER.

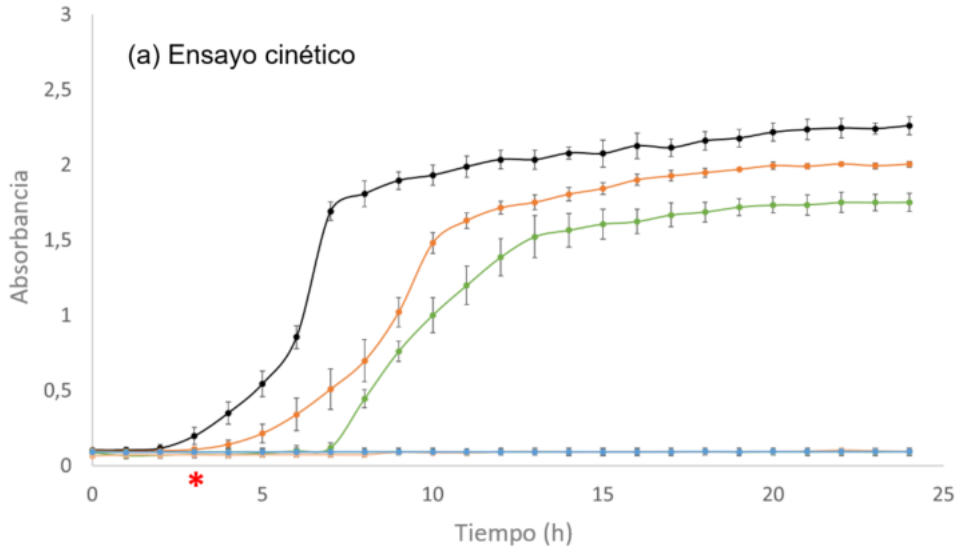
Por otro lado, las Figuras 43b a 48b representan las curvas de muerte de las combinaciones sinérgicas, proporcionando una evaluación directa del impacto bactericida de cada tratamiento a lo largo del tiempo. Estas curvas permiten analizar con precisión cómo varían la viabilidad y la supervivencia bacteriana bajo diferentes condiciones experimentales. A diferencia de los gráficos cinéticos previos, que evalúan la inhibición del crecimiento, estas curvas están diseñadas para medir el efecto letal de los compuestos, proporcionando información crucial sobre su capacidad para erradicar completamente la población bacteriana.

Aunque se mantiene la misma codificación de colores, en este caso solo se representan las curvas correspondientes al TER y los antibióticos por separado a la concentración de la sinergia, la combinación sinérgica y el control.

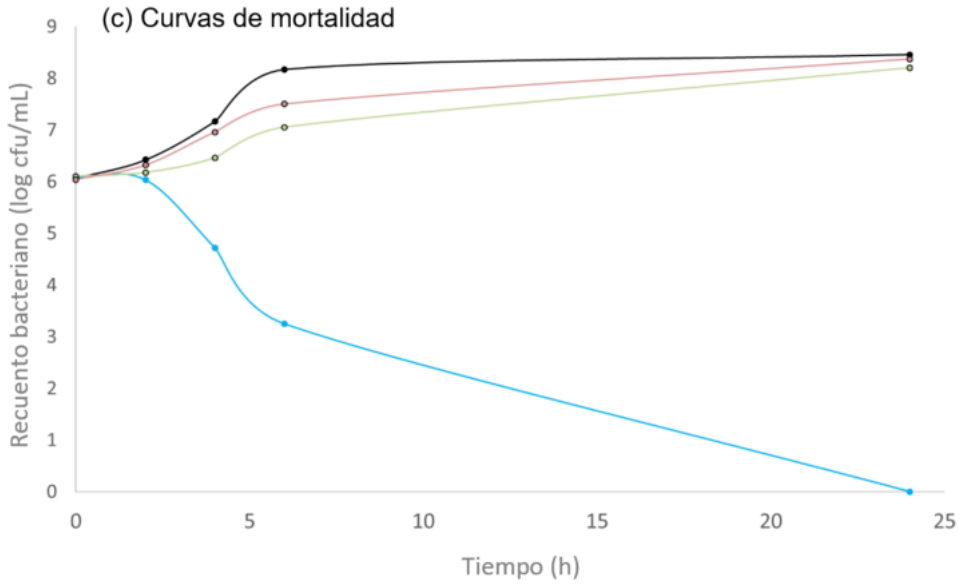
Los resultados muestran un aumento significativo en la mortalidad celular en todos los casos. Esto sugiere que, además de inhibir la proliferación bacteriana, las combinaciones sinérgicas poseen un efecto letal que favorece la eliminación completa de las bacterias.

Estos hallazgos refuerzan el potencial terapéutico de las combinaciones sinérgicas, ya que no solo limitan la replicación bacteriana, sino que también favorecen su erradicación, reduciendo la probabilidad de recurrencia de la infección y minimizando el riesgo de que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia.

Figura 46: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y gentamicina frente a S. agalactiae

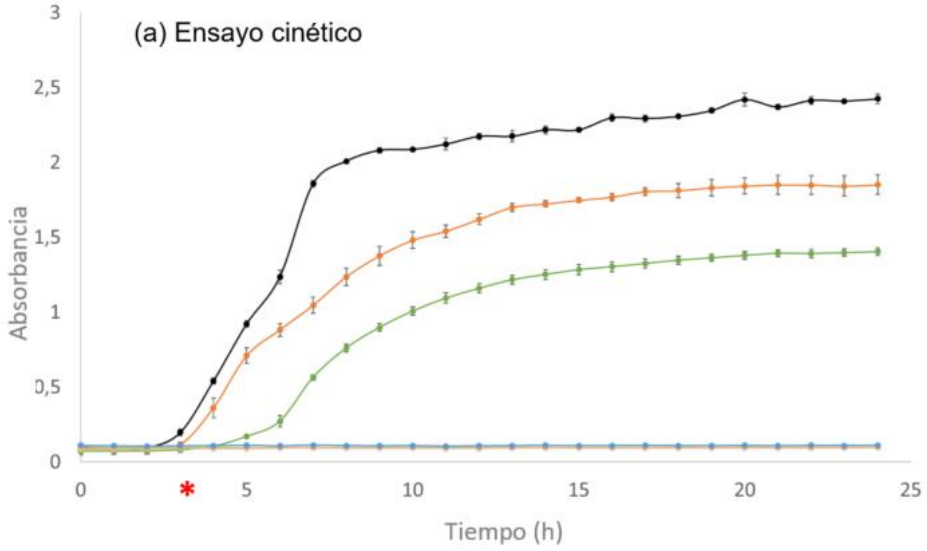


(b) parámetros del modelo	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL)	MIC gentamicina (15.6µg/mL)	Sinergia gentamicina (3.9µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL) + gentamicina (3.9µg/mL)
Cmax (Absorbancia)	2.1	0.6	1.7	0.6	2.0	0.5
r	0.5	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	9.6	>1000	8.7	>1000

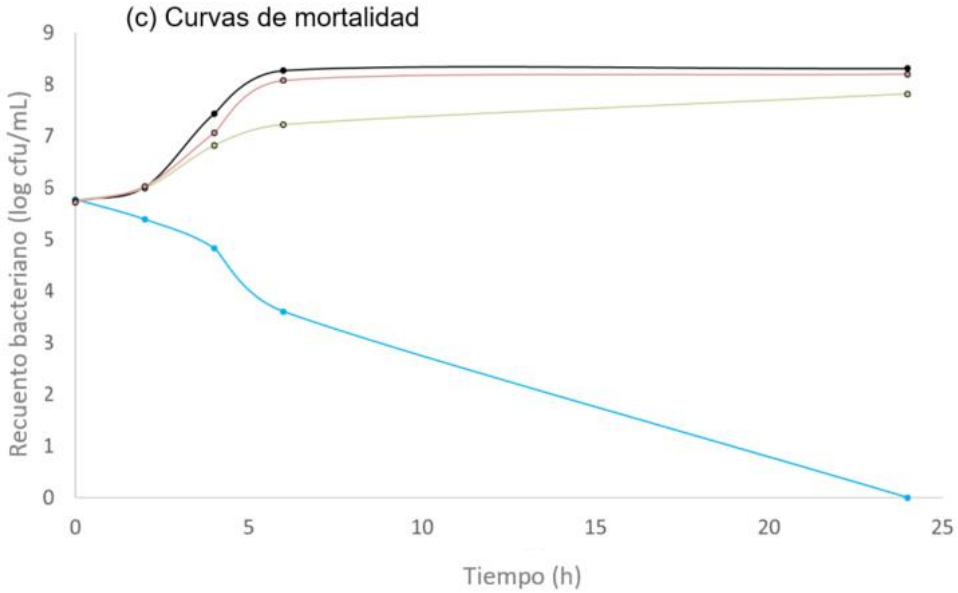


Ensayo cinético (a), parámetros del modelo (b) y curvas de mortalidad (c) de terpineol (líneas verdes) y gentamicina (líneas rojas) contra S. agalactiae. Las curvas negras corresponden al control. Las barras de error representan las desviaciones estándar (n=3). El asterisco rojo indica el momento en que comienzan las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en comparación con el control (ANOVA p≤0.05). Elaboración propia

Figura 47: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y gentamicina frente a A. baumannii

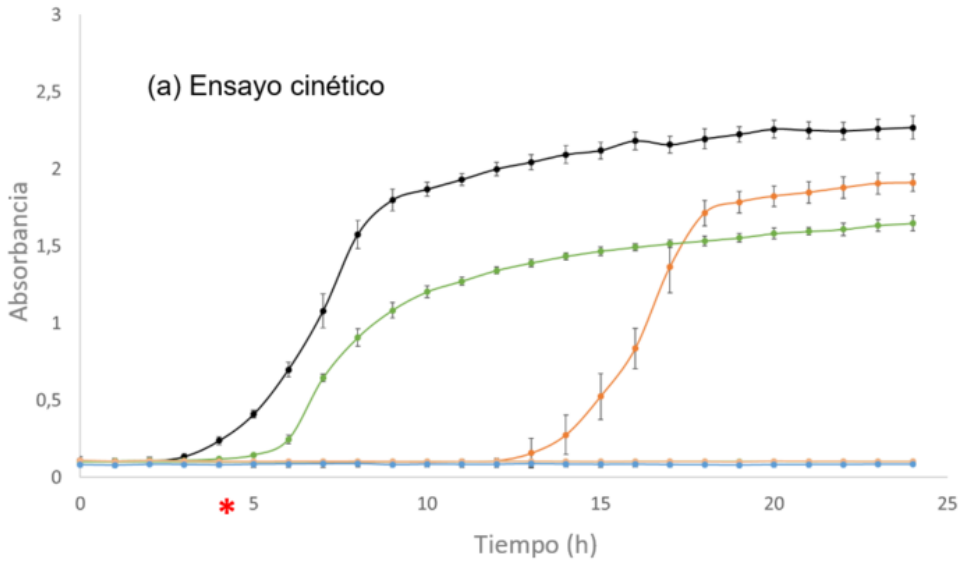


(b) parámetros del modelo	Control	MIC terpineol (250µg/mL)	Sinergia terpineol (62.5µg/mL)	MIC gentamicina (15.6µg/mL)	Sinergia gentamicina (3.9µg/mL)	Sinergia terpineol (62.5µg/mL) + gentamicina (3.9µg/mL)
Cmax (Absorbancia)	2.3	0.8	1.4	0.8	1.8	0.8
r	0.8	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
Tm50 (h)	5.6	>1000	8.0	>1000	6.5	>1000

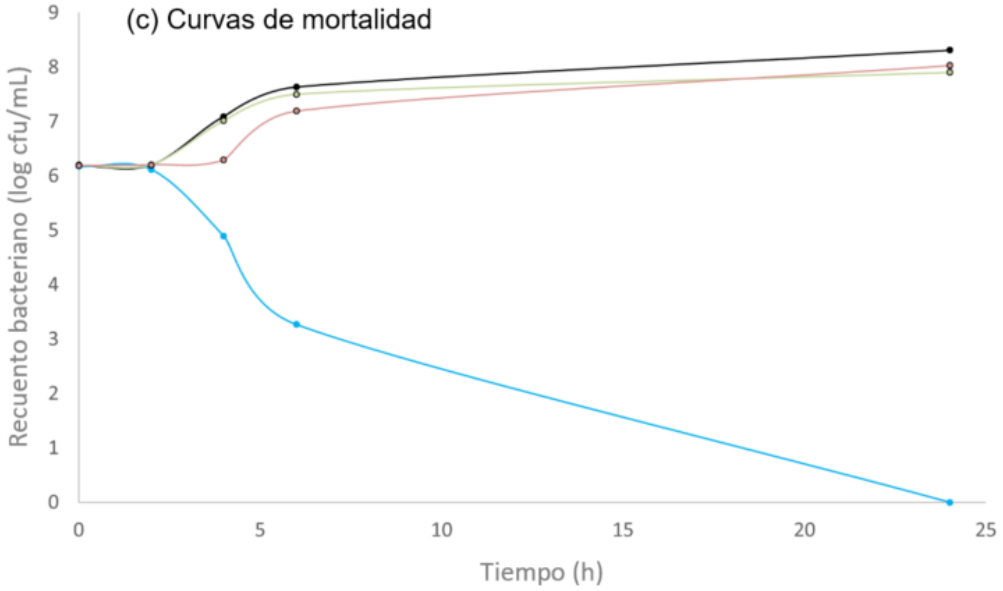


Ensayo cinético (a), parámetros del modelo (b) y curvas de muerte en el tiempo (c) de terpineol (líneas verdes) y gentamicina (líneas rojas) contra A. baumannii. Las curvas negras corresponden al control. Las barras de error representan las desviaciones estándar (n=3). El asterisco rojo indica el momento en que comienzan las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en comparación con el control (ANOVA p≤0.05). Elaboración propia.

Figura 48: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y gentamicina frente a S. aureus

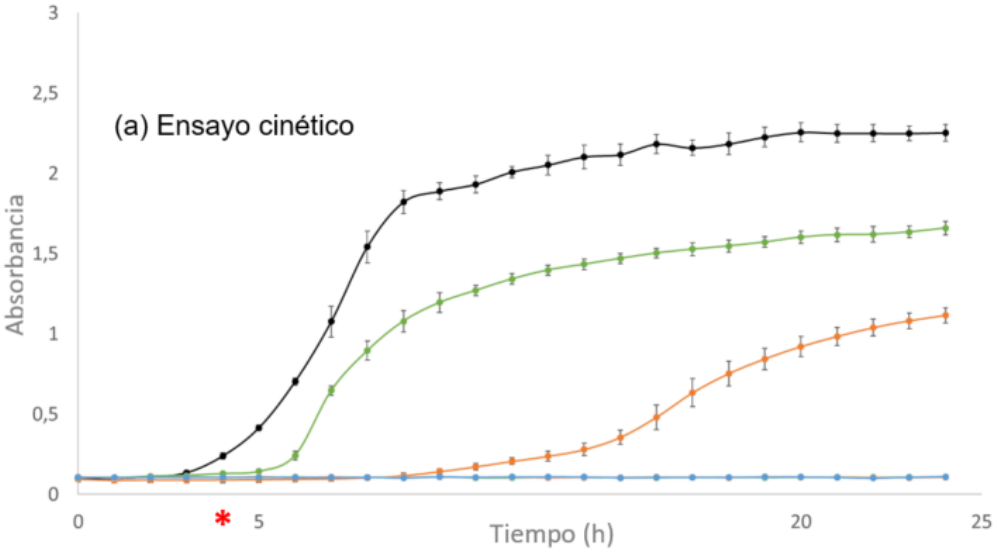


(b) parámetros del modelo	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL)	MIC gentamicina (15.6µg/mL)	Sinergia gentamicina (3.9µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL) + gentamicina (3.9µg/mL)
Cmax (Absorbancia)	2.2	0.7	1.6	0.7	1.9	0.7
r	0.7	0.0	0.6	0.0	0.9	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	7.9	>1000	16.1	>1000

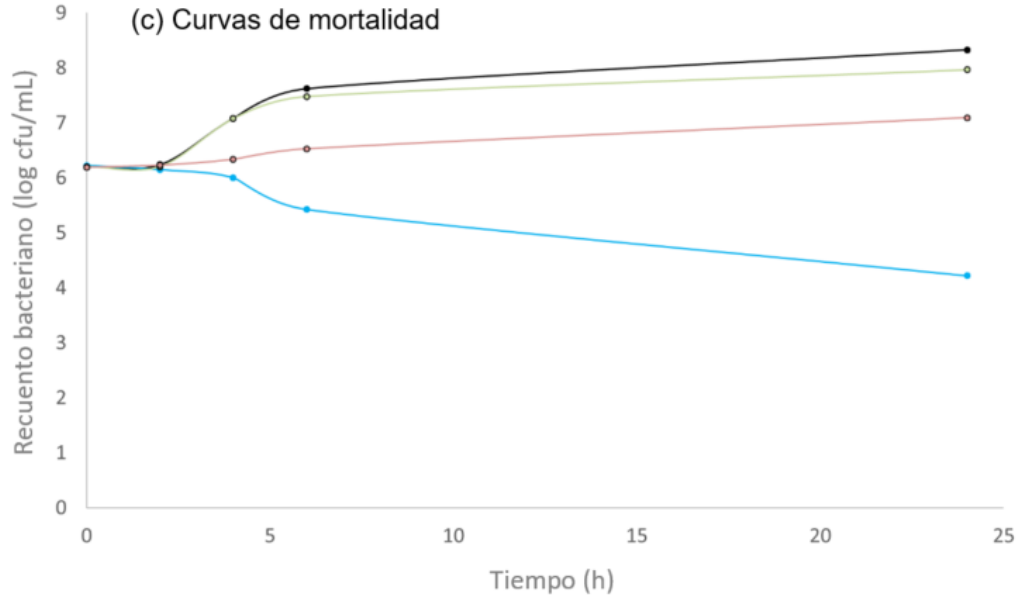


Ensayo cinético (a), parámetros del modelo (b) y curvas de muerte en el tiempo (c) de terpineol (líneas verdes) y gentamicina (líneas rojas) contra S. aureus. Las curvas negras corresponden al control. Las barras de error representan las desviaciones estándar (n=3). El asterisco rojo indica el momento en que comienzan las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en comparación con el control (ANOVA p≤0.05). Elaboración propia

Figura 49: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y florfenicol frente a S. aureus

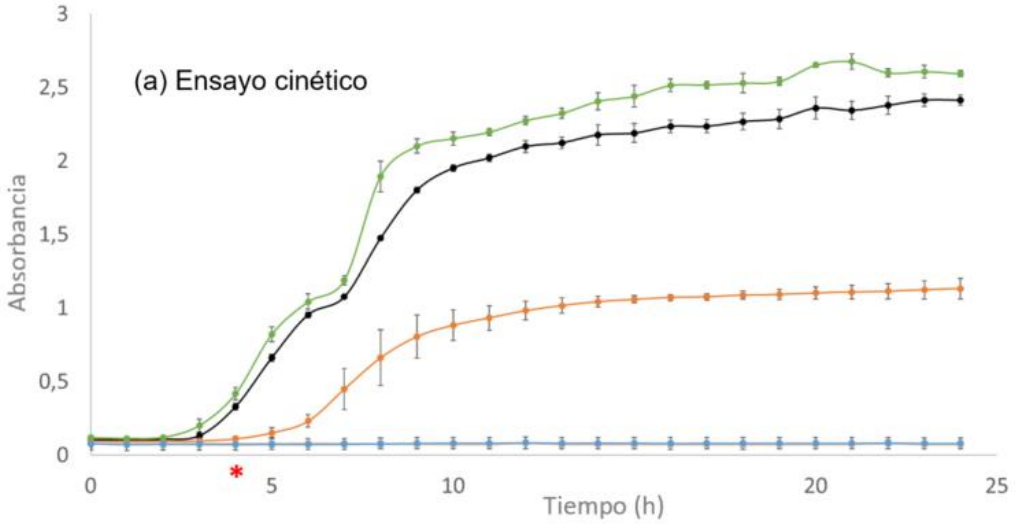


(b) parámetros del modelo	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Sinergia terpineol (62.5µg/mL)	MIC florfenicol (31.2µg/mL)	Sinergia florfenicol (7.8µg/mL)	Sinergia terpineol (62.5µg/mL) + florfenicol (7.8µg/mL)
Cmax (Absorbancia)	2.2	0.9	1.6	0.9	1.3	0.9
r	0.7	0.0	0.5	0.0	0.3	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	8.0	>1000	17.7	>1000

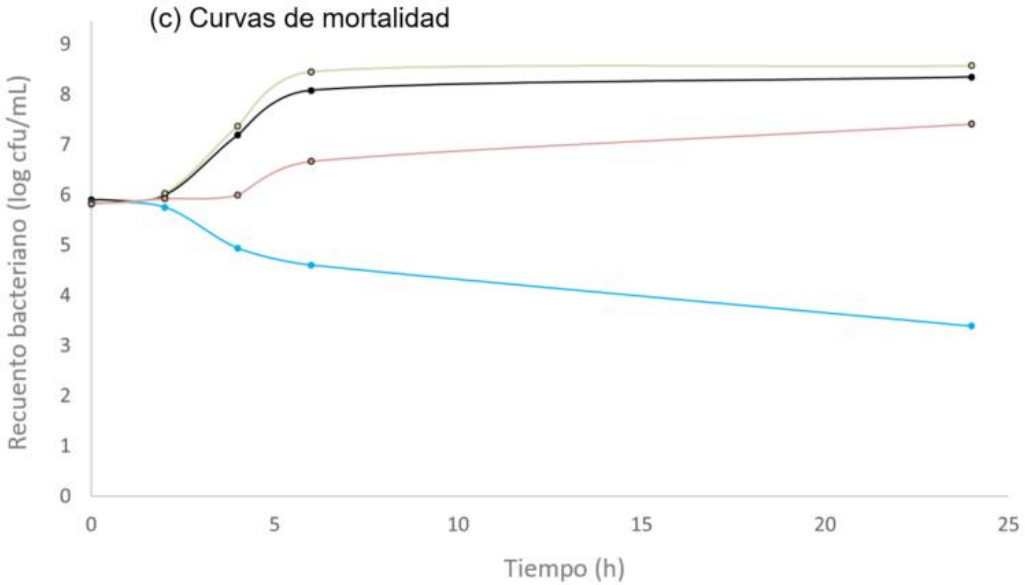


Ensayo cinético (a), parámetros del modelo (b) y curvas de muerte en el tiempo (c) de terpineol (líneas verdes) y florfenicol (líneas rojas) contra S. aureus. Las curvas negras corresponden al control. Las barras de error representan las desviaciones estándar (n=3). El asterisco rojo indica el momento en que comienzan las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en comparación con el control (ANOVA p≤0.05). Elaboración propia.

Figura 50: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y cloranfenicol frente a S. marcescens

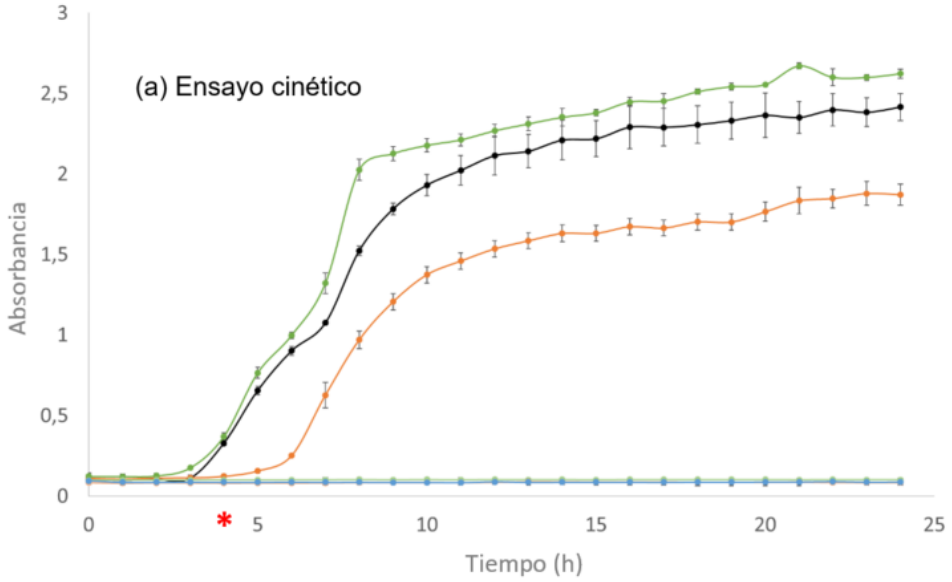


(b) parámetros del modelo	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL)	MIC cloranfenicol (125µg/mL)	Sinergia cloranfenicol (15.6µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL) + cloranfenicol (15.6µg/mL)
Cmax (Absorbance)	2.3	0.6	2.5	0.6	1.1	0.6
r	0.5	0.0	0.5	0.0	0.6	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	6.7	>1000	7.6	>1000

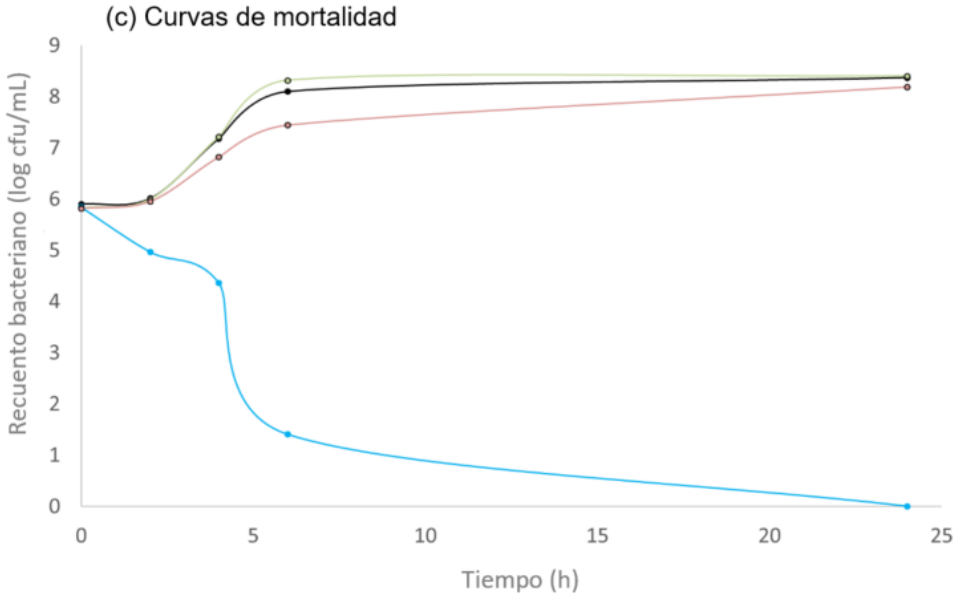


Ensayo cinético (a), parámetros del modelo (b) y curvas de muerte en el tiempo (c) de terpineol (líneas verdes) y florfenicol (líneas rojas) contra S. marcescens. Las curvas negras corresponden al control. Las barras de error representan las desviaciones estándar (n=3). El asterisco rojo indica el momento en que comienzan las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en comparación con el control (ANOVA p≤0.05). Elaboración propia.

Figura 51: Dinámica de crecimiento y muerte bacteriana de la combinación de terpineol y tetraciclina frente a S. marcescens



(b) parámetros del modelo	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL)	MIC tetraciclina (62.5µg/mL)	Sinergia tetraciclina (15.6µg/mL)	Sinergia terpineol (125µg/mL) + tetraciclina (15.6µg/mL)
Cmax (Absorbancia)	2.3	0.6	2.5	0.6	1.1	0.7
r	0.5	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	6.5	>1000	7.6	>1000



Ensayo cinético (a), parámetros del modelo (b) y curvas de muerte en el tiempo (c) de terpineol (líneas verdes) y florfenicol (líneas rojas) contra S. marcescens. Las curvas negras corresponden al control. Las barras de error representan las desviaciones estándar (n=3). El asterisco rojo indica el momento en que comienzan las diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en comparación con el control (ANOVA p≤0.05). Elaboración propia

Hasta el momento, no se han descrito estudios que analicen en detalle los efectos sinérgicos del TER en combinación con antibióticos frente a las bacterias seleccionadas. No obstante, existen evidencias preliminares que apuntan a interacciones sinérgicas entre extractos vegetales con bajos porcentajes de TER y determinados antibióticos, en particular los aminoglucósidos (Xing et al. 2022, Mendes et al. 2015). En cuanto al compuesto puro, estudios *in silico* han señalado posibles efectos aditivos entre TER y metronidazol frente a *Helicobacter pylori* (Altawalbeh et al. 2022), así como entre α-terpineol y gentamicina en *P. aeruginosa* (Chadha et al. 2022). Sin embargo, todavía no se han llevado a cabo estudios experimentales exhaustivos en un amplio número de especies bacterianas, ya sea en modelos in vitro o in vivo, que permitan confirmar dichos hallazgos.

Los posibles mecanismos que explican el aumento de eficacia observado en GTM, FF, CHL y TC cuando se combinan con TER podrían estar relacionados con distintas interacciones entre los productos naturales y los antibióticos, las cuales pueden potenciar la actividad antimicrobiana.

Uno de los mecanismos más relevantes es la alteración de la estructura y función de las membranas celulares inducida por los monoterpenos. Esta disrupción de la membrana puede aumentar la permeabilidad celular, comprometiendo la integridad de la bacteria y facilitando el acceso del antibiótico a su diana intracelular, potenciando su efecto bactericida o bacteriostático (Sikkema et al. 1994).

Además, los productos naturales han demostrado capacidad para modular diversos mecanismos de resistencia bacteriana. Se ha descrito que ciertos compuestos naturales pueden inhibir enzimas extracelulares responsables de la degradación de antibióticos, reducir la síntesis de polisacáridos capsulares (los cuales protegen a la bacteria del efecto de ciertos fármacos) y desactivar bombas de eflujo, lo que lleva a una mayor retención intracelular de los antibióticos y, por tanto, a un incremento en su eficacia (Dong et al. 2012a, Qiu et al. 2012, Suganya et al. 2022).

Otro mecanismo relevante es la interferencia con la señalización de quorum sensing y sus receptores, un proceso clave en la regulación de la virulencia y la formación de biopelículas en muchas bacterias patógenas. Al afectar el sistema de señalización, los productos naturales como TER podrían reducir la capacidad de las bacterias para

coordinar la expresión de factores de virulencia y resistencia, haciéndolas más susceptibles a la acción de los antibióticos (Dassanayake, Khoo and An 2021) .

Según el mecanismo de acción previamente descrito para TER en la sección 7.2.4, es plausible que, en sinergia con los antibióticos, este compuesto desestabilice las membranas celulares bilipídicas tanto de bacterias gram-positivas (*S. aureus* y *S. agalactiae*) como gram-negativas (*S. marcescens* y *A. baumannii*), afectando no solo la membrana plasmática, sino también la membrana externa en el caso de las bacterias gram-negativas. Esta disrupción estructural podría generar alteraciones en la distribución de fosfolípidos y proteínas de membrana, comprometiendo la integridad celular. Además, dicha alteración en la barrera celular podría modificar los sitios activos de los antibióticos en la pared celular y la membrana plasmática bacteriana, favoreciendo la penetración y acumulación intracelular de los antibióticos. Como resultado, se facilitaría su acceso a las dianas ribosomales intracelulares, lo que potenciaría su actividad antimicrobiana, reduciría la MIC y, en consecuencia, disminuiría la dosis necesaria para lograr un efecto terapéutico óptimo.

Este efecto permeabilizador inespecífico de los fitoquímicos sobre las membranas bacterianas ha sido propuesto por diversos estudios como un mecanismo clave en la potenciación de la acción antibiótica, ya que podría sensibilizar a las bacterias y modular su susceptibilidad a los antibióticos a concentraciones más bajas (Kaur et al. 2021, Simões, Bennett and Rosa 2009, Vattem et al. 2005).

Sin embargo, este mecanismo de acción puede presentar variaciones o efectos adicionales, ya que el comportamiento de TER y cada antibiótico aplicado individualmente varía según la especie bacteriana, lo que sugiere que la interacción sinérgica no se debe únicamente a la disrupción de la membrana, sino a un conjunto más complejo de factores.

El primer efecto destacable es que TER, a su concentración sinérgica, exhibe una actividad antimicrobiana más pronunciada contra *S. agalactiae* y *A. baumannii* en comparación con GTM, como lo reflejan los valores más elevados de Cmax del antibiótico (Figuras 46a y 47a). GTM es un aminoglucósido de amplio espectro que se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas y resultando efectivo contra estreptococos gram-positivos y *A. baumannii*. No obstante, los resultados muestran que, cuando se administran por separado, ni TER ni GTM logran inducir la

erradicación total de las bacterias (Figuras 46b y 47b). En contrapartida, los resultados obtenidos muestran que la sinergia entre TER y GTM no solo potencia la actividad de GTM, sino que también logra un efecto bactericida significativo, reduciendo la población bacteriana en aproximadamente 8 log CFU/mL en comparación con los controles respectivos. Este efecto letal sugiere que la combinación de TER y GTM podría estar actuando a través de múltiples mecanismos complementarios, más allá de la simple disrupción de la membrana.

Además del efecto previamente discutido de TER en la desestabilización de la membrana celular, se ha propuesto un mecanismo alternativo para la sinergia entre α-terpineol y GTM en otra bacteria gram-negativa, *P. aeruginosa*. En particular, se ha observado que TER puede reducir la expresión de genes clave involucrados en este proceso, disminuyendo la producción de N-acil homoserina lactona (AHL), una molécula señal responsable de coordinar la expresión de factores de virulencia y la formación de biopelículas (Chadha et al. 2022).

Dado que el quorum sensing regula múltiples mecanismos de resistencia y virulencia en bacterias patógenas, la capacidad de TER para alterar este sistema podría debilitar las defensas bacterianas y aumentar la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos. En este contexto, la combinación de los efectos de TER en la permeabilización de la membrana con su capacidad para modular la señalización quorum sensing representa una estrategia doblemente efectiva que podría explicar la elevada eficacia antimicrobiana observada en las sinergias GTM/TER contra *S. agalactiae* y *A. baumannii*.

El segundo efecto relevante se observa en las Figuras 48a y 49a, que representan la curva cinética de *S. aureus* expuesto a los antibióticos GTM y FF en combinación con TER. En ambos casos, aunque más pronunciado en GTM, se evidencia que el crecimiento bacteriano se recupera tras la exposición individual a GTM (después de aproximadamente 12 horas) o a FF (después de 11 horas). Sin embargo, esta recuperación no ocurre cuando se administra la combinación sinérgica con TER.

Este fenómeno indica que, aunque los parámetros farmacocinéticos como Cmax y *r* no reflejan directamente estas diferencias, la recuperación retardada del crecimiento bacteriano en presencia de los antibióticos individuales se manifiesta en un *Tm50* para GTM que es más del doble que el de TER. Esto sugiere que la presencia de TER prolonga

el efecto antibiótico y evita la reactivación de la población bacteriana, posiblemente a través de la alteración de la membrana celular y la interferencia con la homeostasis bacteriana.

Desde el punto de vista del mecanismo de acción de los antibióticos, tanto GTM como FF inhiben la síntesis de proteínas, pero lo hacen a través de dianas diferentes: mientras GTM se une a la subunidad ribosomal 30S, impidiendo la traducción y la producción de proteínas esenciales para la supervivencia bacteriana, FF actúa sobre la subunidad 50S, interfiriendo con la actividad de la peptidil transferasa y bloqueando la elongación de la cadena polipeptídica. La combinación de estos mecanismos con la acción de TER podría estar potenciando el colapso de la síntesis proteica en *S. aureus*, reduciendo su capacidad de recuperación y prolongando la eficacia del tratamiento.

El efecto de TER, como en otros casos, se mantiene más constante a lo largo del tiempo, lo que probablemente se debe a su capacidad para alterar de manera sostenida la envoltura bacteriana, comprometiendo la integridad de la membrana plasmática y la homeostasis celular. Las curvas de muerte bacteriana correspondientes a estas sinergias (Figuras 48b y 49b) reflejan claramente este efecto: en el caso de GTM, la combinación con TER logra una erradicación completa de la población bacteriana a las 24 horas, con una reducción del 100% en la viabilidad celular. Por otro lado, aunque la combinación con FF también demuestra un efecto bactericida significativo, la mortalidad es menor, alcanzando un 49% en el mismo período de tiempo. Esta diferencia sugiere que, si bien la sinergia con TER potencia la actividad de ambos antibióticos, su eficacia final varía en función del mecanismo de acción específico de cada uno. El mayor impacto de la sinergia GTM/TER en la erradicación bacteriana podría deberse a la naturaleza complementaria de sus mecanismos de acción. GTM, al unirse a la subunidad 30S del ribosoma, inhibe la síntesis de proteínas de manera irreversible, lo que puede llevar más rápidamente a la muerte celular cuando se combina con la desestabilización de la membrana inducida por TER. En cambio, FF, al actuar sobre la subunidad 50S e interferir con la actividad de la peptidil transferasa, tiene un mecanismo de inhibición más modulable, lo que podría permitir que algunas bacterias sobrevivan a la combinación sinérgica.

La recuperación del crecimiento de *S. aureus* tras la exposición a GTM o FF podría atribuirse a la selección de individuos más resistentes con el tiempo, dado que esta bacteria exhibe múltiples mecanismos de resistencia. En particular, *S. aureus* cuenta con una serie de estrategias para contrarrestar los efectos de estos antibióticos, incluyendo

la sobreexpresión de bombas de eflujo y la producción de enzimas modificadoras de antibióticos, como las aminoglucósido-modificantes en el caso de GTM (Kelmani Chandrakanth, Raju and Patil 2008) y la cloranfenicol acetiltransferasa en el caso de FF (Wu et al. 2021). Asimismo, la bacteria puede adquirir mutaciones que alteran la estructura de sus ribosomas, dificultando la unión de los antibióticos a sus dianas moleculares (Wu et al. 2021), como se discutirá en la siguiente sección.

Una posible explicación de por qué la sinergia entre TER y GTM o FF impide la recuperación de *S. aureus* puede deberse a efectos multitarget, un fenómeno en el que múltiples dianas celulares se ven afectadas simultáneamente, dificultando la adaptación de la bacteria y reduciendo su capacidad de desarrollar resistencia (Langeveld, Veldhuizen and Burt 2014). Además de su acción sobre la membrana celular, TER podría estar interfiriendo con mecanismos específicos de resistencia bacteriana, en particular con aquellos relacionados con la envoltura bacteriana, como las bombas de eflujo (Langeveld et al. 2014). Por ejemplo, se ha reportado que ciertos compuestos naturales, como el propóleo, bloquean la actividad de las bombas de eflujo en *S. aureus*, lo que aumenta la concentración intracelular de antibióticos y prolonga su efecto bactericida (Alsallami et al. 2023). Aunque el mecanismo exacto aún no se ha elucidado completamente, este tipo de interacción sugiere que TER podría estar funcionando de manera similar, reduciendo la capacidad de *S. aureus* para expulsar los antibióticos y evitando así la recuperación de su crecimiento.

Finalmente, en el caso de *S. marcescens*, se observa un comportamiento distinto del TER que contrasta con su efecto inhibitorio en otras bacterias. Como se muestra en las Figuras 50 y 51, en lugar de reducir el crecimiento bacteriano, TER parece promover un aumento significativo en la proliferación de *S. marcescens*. Este efecto se traduce en un incremento de Cmax y una reducción en el tiempo necesario para alcanzar el 50% de Cmax (Tm50), lo que sugiere que, lejos de afectar negativamente a esta bacteria, TER podría estar actuando como un sustrato metabólico o estimulador del crecimiento. Este fenómeno no es completamente inesperado, ya que existen antecedentes que indican la capacidad de ciertas cepas de *S. marcescens* para metabolizar monoterpenos. En particular, se ha reportado que una cepa aislada de lodos residuales puede oxidar el α-pineno, un monoterpeno derivado de aceites esenciales de plantas, utilizándolo como fuente de carbono y energía (Wright et al. 1986). Esto sugiere que *S. marcescens* podría poseer vías enzimáticas capaces de descomponer y aprovechar ciertos terpenos,

incluyendo TER, lo que explicaría su efecto estimulante sobre el crecimiento bacteriano en lugar de su inhibición.

A pesar de este efecto de TER en el crecimiento de *S. marcescens*, su combinación con antibióticos como CHL y TC genera un resultado opuesto, evidenciando una inhibición total del crecimiento bacteriano. Como se observa en las curvas de viabilidad celular, esta sinergia provoca una reducción de 5 log CFU/mL en comparación con el control, lo que indica un efecto bactericida significativo. El impacto de estas combinaciones sugiere que, aunque *S. marcescens* pueda metabolizar TER, la presencia simultánea de antibióticos anula su capacidad de crecimiento. Una posible explicación es que TER podría estar afectando la permeabilidad de la membrana celular, facilitando la entrada de CHL y TC en la célula y potenciando su acción antimicrobiana. Alternativamente, la activación de rutas metabólicas asociadas al procesamiento de TER podría inducir un estrés celular adicional que haga a la bacteria más vulnerable a los antibióticos.

Formulaciones específicas que contienen TER han sido aprobadas por la EPA y la FDA para su uso en determinados productos destinados al consumo humano (FDA, 2011). Su estatus regulatorio podría facilitar su incorporación como coadyuvante en terapias antibióticas, permitiendo reducir la concentración necesaria de antibióticos y, en consecuencia, minimizar los efectos secundarios asociados, como la toxicidad renal y hepática, las alteraciones en la microbiota intestinal y la aparición de reacciones adversas en pacientes sensibles.

7.4.4 Determinación de los efectos en la generación de resistencias de las sinergias

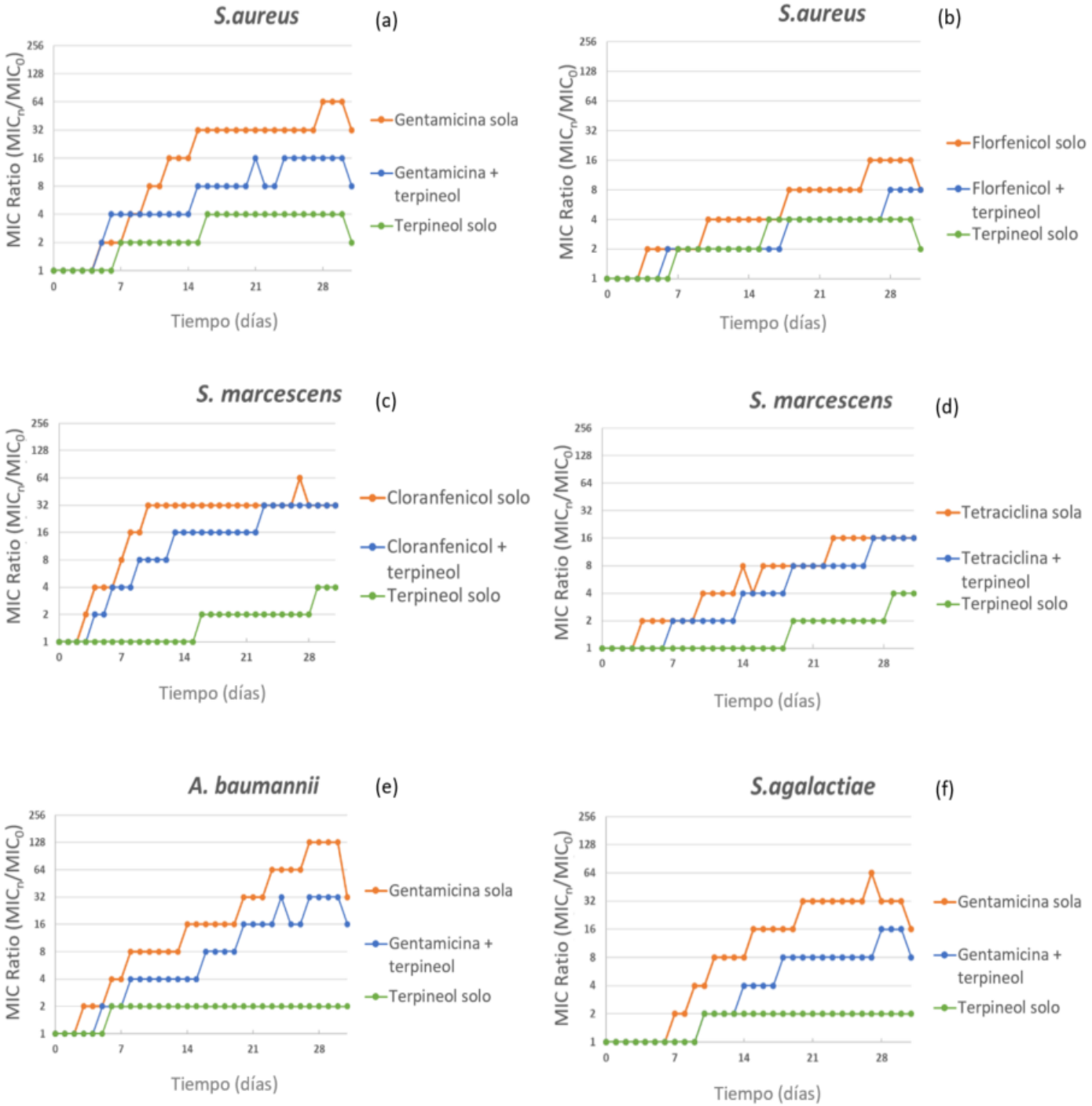
La Figura 49 ilustra la evolución de las MIC del TER, los antibióticos y sus sinergias en el método de "*serial passage*", proporcionando una visión detallada sobre la dinámica de la resistencia bacteriana a lo largo del tiempo. El hallazgo más relevante es que, en todos los casos, la combinación TER + antibiótico presenta una menor capacidad de inducir resistencia en comparación con los antibióticos utilizados en solitario a sus respectivas concentraciones de MIC. Este efecto sugiere que la sinergia entre TER y los antibióticos puede ser una estrategia efectiva para retrasar la aparición de resistencia. Sin embargo, en algunos escenarios, tras una exposición prolongada, la MIC de la

combinación puede eventualmente alcanzar el mismo valor de MIC del antibiótico individual, un fenómeno observado a partir de los 28 días.

En contraste, los antibióticos evaluados mostraron una tendencia significativamente mayor a inducir resistencia bacteriana, con incrementos en la MIC que oscilaron entre 8 y 32 veces su valor inicial. Particularmente, la GTM generó resistencia de manera rápida en diferentes especies bacterianas: *S. aureus*, *A. baumannii* y *S. agalactiae* alcanzaron niveles de resistencia elevados en los días 8, 6 y 9, respectivamente. Estos resultados evidencian la alta presión selectiva ejercida por los antibióticos convencionales cuando se utilizan de forma aislada.

Por otro lado, TER exhibió la menor capacidad para inducir resistencia entre los compuestos analizados. En los casos de *S. aureus* y *S. marcescens*, el aumento máximo registrado en la CIM fue de solo 4 veces su concentración inicial, lo que se encuentra en el umbral considerado como indicativo de generación de resistencia (Clark et al. 2009, Farrell David et al. 2011). Este dato resalta el potencial de TER como una opción terapéutica menos propensa a inducir resistencia en comparación con los antibióticos tradicionales, lo que podría ser clave para diseñar estrategias de tratamiento más sostenibles a largo plazo.

Figura 52: Impacto de tratamientos individuales y combinados en la selección de resistencia antimicrobiana



Efecto de los antibióticos (línea naranja), el terpineol (línea verde) y las combinaciones sinérgicas (líneas azules) sobre la selección de resistencia (pase serial) en S. aureus*,* S. marcescens*,* A. baumannii *y* S. agalactiae*. MIC$_0$ (concentración mínima inhibitoria inicial), MIC$_n$ (concentración mínima inhibitoria en un día determinado (n)). Elaboración propia*

Dado que las poblaciones bacterianas de cada cepa utilizadas en este estudio son puras, el incremento en las MIC detectadas no puede explicarse por una selección de subpoblaciones iniciales más resistentes dentro de la misma, ya que todas las bacterias presentan un perfil genético homogéneo. Además, la transferencia horizontal de genes, un mecanismo común de diseminación de resistencia, tampoco es un factor relevante en este sistema experimental. Esto se debe a que las cepas utilizadas son de referencia, previamente genotipadas, y no poseen plásmidos portadores de genes de resistencia adquirida. En consecuencia, cualquier resistencia emergente en estos ensayos debe atribuirse a dos mecanismos principales: la expresión de genes de resistencia intrínsecos o la aparición de mutaciones espontáneas que confieren una ventaja selectiva a ciertas subpoblaciones bacterianas expuestas a los antimicrobianos a lo largo del tiempo. De hecho, la cepa de referencia *S. marcescens* empleada en este desarrollo experimental cuenta con diversos genes de resistencia intrínseca, los cuales serán analizados en detalle más adelante.

Sin embargo, la dinámica de selección y expresión de estos mecanismos de resistencia varía en función del tratamiento aplicado, ya sea el antibiótico solo, TER solo o la combinación sinérgica de ambos. Cada una de estas condiciones experimentales puede inducir distintos mecanismos de resistencia, activando o favoreciendo estrategias específicas que las bacterias emplean para sobrevivir en presencia de estos agentes antimicrobianos. En este contexto, la evaluación comparativa de los efectos de los antibióticos y su combinación con TER es crucial para entender cómo la sinergia entre ambos puede modificar la evolución de la resistencia bacteriana y, potencialmente, mitigar su desarrollo a largo plazo.

7.4.2.1 Efectos en la generación de resistencias por parte del terpineol

Se ha observado que TER presenta una menor capacidad para inducir resistencia bacteriana en comparación con los antibióticos convencionales. Esto se debe, probablemente, a que su mecanismo de acción no es tan específico como el de los antibióticos, lo que dificulta la selección de mutaciones puntuales que confieran resistencia. Como se ha mencionado, la acción principal de TER es la alteración de la integridad de las membranas bacterianas, un proceso que afecta múltiples estructuras y funciones celulares simultáneamente. A diferencia de los antibióticos que actúan sobre objetivos bien definidos, como las enzimas o las subunidades ribosomales, la alteración de la membrana implica un mecanismo menos propenso a la evolución de resistencia

por simples modificaciones genéticas. Sin embargo, es posible que algunas especies bacterianas puedan recurrir a mecanismos de resistencia inespecíficos, como el refuerzo de la estructura de la membrana, la modificación de su composición lipídica o el aumento de la expresión de bombas de expulsión activa. Estas estrategias podrían conferir cierta tolerancia a TER en condiciones específicas, pero hasta la fecha no se han reportado casos ampliamente documentados de generación de resistencia microbiana causada por el TER.

Existe sin embargo un estudio aislado en *Staphylococcus aureus* que ha identificado un posible mecanismo de adaptación. En este caso, la cepa SH 1000 de *S. aureus* fue tratada con terpinen-4-ol, un monoterpeno extraído del aceite de árbol de té, observándose la sobreexpresión de genes que codifican bombas de expulsión de fármacos (Cuaron et al. 2013). Esta respuesta adaptativa sugiere que la bacteria podría desarrollar resistencia a los terpenos mediante un aumento en la actividad de estas bombas de eflujo, facilitando la eliminación del compuesto antes de que pueda ejercer su efecto letal.

Este mecanismo de adaptación podría explicar el leve incremento en la resistencia a TER observado en las Figuras 52a y 52b. Aunque la magnitud de este efecto es limitada, sugiere que, bajo una exposición prolongada, algunas bacterias podrían desarrollar estrategias para reducir su sensibilidad a TER. No obstante, en comparación con los antibióticos tradicionales, este fenómeno parece ocurrir con menor frecuencia y eficiencia.

7.4.4.1 Efectos en la generación de resistencias por parte de los antibióticos

Por otro lado, los antibióticos utilizados en este estudio presentan mecanismos de acción altamente específicos, lo que los hace particularmente eficaces en la inhibición de procesos esenciales para la supervivencia bacteriana. Del mismo modo, esta especificidad también facilita la aparición de resistencias, ya que una única mutación puntual en el sitio de acción del antibiótico puede ser suficiente para reducir la eficacia antimicrobiana. En este estudio, los cuatro antibióticos evaluados tienen en común su mecanismo de acción sobre objetivos ribosomales, interfiriendo en la síntesis proteica bacteriana. Los ribosomas son estructuras altamente conservadas, pero a pesar de ello, las bacterias pueden desarrollar resistencia mediante múltiples mecanismos. Entre estos, destacan las mutaciones en los genes que codifican las proteínas ribosomales o en el

ARN ribosómico, lo que reduce la afinidad del antibiótico por su diana y, por ende, su eficacia (Wilcox Sheri, Cavey Gregory and Pearson James 2001, Gomez et al. 2017, Miyazaki and Kitahara 2018).

Además de las mutaciones puntuales en las regiones codificantes del ribosoma, otro mecanismo importante es la metilación del ARN ribosómico, mediada por metiltransferasas específicas. Este tipo de modificación estructural impide que el antibiótico pueda unirse eficazmente a su objetivo, confiriendo una resistencia de alto nivel (Osterman, Dontsova and Sergiev 2020). También pueden participar otras estrategias adaptativas, como la sobreexpresión de bombas de eflujo, que reducen la concentración intracelular del antibiótico (Poole 2005), o la activación de sistemas de modificación enzimática, que inactivan el fármaco antes de que pueda ejercer su efecto (Ramirez and Tolmasky 2010).

Estos mecanismos de resistencia bacteriana no solo dependen de mutaciones adquiridas en respuesta a la presión selectiva del antibiótico. En muchos casos, las bacterias poseen genes de resistencia intrínseca codificados en su cromosoma, los cuales pueden jugar un papel crucial en la adaptación al tratamiento antimicrobiano (Jian et al. 2021, Harris et al. 2023). En las cepas de referencia empleadas, la presencia de estos genes cromosómicos puede proporcionar una resistencia basal a ciertos antibióticos, facilitando la posterior selección de mutantes resistentes durante la exposición prolongada al fármaco.

Resistencias en Acinetobacter baumannii

Los mecanismos de resistencia de *A. baumannii* contra los aminoglucósidos, como la GTM, han sido ampliamente documentados y representan un desafío significativo en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria (Kyriakidis et al. 2021). *A. baumannii* es reconocido por su capacidad de adquirir y desarrollar resistencia a múltiples clases de antibióticos, incluyendo los aminoglucósidos, lo que lo convierte en un patógeno prioritario en salud pública debido a su papel en infecciones nosocomiales difíciles de tratar (Alexander et al. 2024).

Entre los principales mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos en *A. baumannii* se encuentra la inactivación enzimática del antibiótico mediante la acción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs, por sus siglas en inglés), que alteran

la estructura del antibiótico y reducen su capacidad de unión al ribosoma. Estas enzimas pueden fosforilar, adenilar o acetilar la molécula del aminoglucósido, bloqueando así su función bactericida. Otro mecanismo clave es la modificación del objetivo ribosomal mediante la metilación del ARN ribosómico 16S por metiltransferasas específicas, lo que impide la interacción del antibiótico con el ribosoma y evita su acción inhibitoria sobre la síntesis proteica. Este tipo de modificación estructural es particularmente preocupante, ya que confiere resistencia de alto nivel a múltiples aminoglucósidos simultáneamente, reduciendo drásticamente las opciones terapéuticas (Jouybari et al. 2021).

Adicionalmente, *A. baumannii* puede desarrollar resistencia mediante la reducción de la permeabilidad de la membrana y el aumento de la actividad de bombas de expulsión. La bacteria puede modificar la composición de su membrana externa para disminuir la entrada de antibióticos, reduciendo la expresión de porinas, proteínas esenciales para el transporte de moléculas a través de la membrana. De manera complementaria, puede incrementar la actividad de bombas de expulsión activas que eliminan el antibiótico antes de que alcance su sitio de acción, reduciendo su efectividad (Kyriakidis et al. 2021).

Dado su amplio repertorio de mecanismos de resistencia, *A. baumannii* exhibe una notable capacidad de adaptación a la presión selectiva ejercida por los antibióticos. Estudios epidemiológicos han demostrado que esta bacteria ha adquirido resistencia a los aminoglucósidos en un 19 % a 31 % de los casos, lo que refleja su gran plasticidad genética y su capacidad de evolucionar frente a la terapia antimicrobiana (Vázquez-López et al. 2020). A nivel genómico, la resistencia a los aminoglucósidos en A. baumannii se ha asociado principalmente con genes como aac(2')-Ib, aph(3")-Ib y aph(6)-Id (Davies 1979) , que codifican enzimas responsables de la modificación química de los antibióticos, impidiendo su acción bactericida. Sin embargo, en nuestras cepas de referencia, estos genes no están presentes, lo que sugiere que la resistencia observada se ha adquirido a lo largo del experimento mediante los anteriores mecanismos alternativos.

Resistencias en *Serratia marcescens*

S. marcescens es una bacteria oportunista con una notable capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo la TC y el CHL. La resistencia a la TC en *S. marcescens* se debe principalmente a la expresión de bombas de expulsión

activas, que eliminan el antibiótico de la célula antes de que pueda ejercer su efecto bacteriostático sobre la síntesis proteica. En la cepa de referencia empleada en este estudio, esta resistencia está mediada por los genes tetR/tetA, los cuales regulan la expresión y el funcionamiento de estas bombas de eflujo. Además de tetR/tetA, se han identificado otros genes asociados con la resistencia a la tetraciclina, como tetC, tetG y tetH, que codifican variantes de estas bombas de expulsión. Aunque estos genes se encuentran con mayor frecuencia en plásmidos, lo que facilita su diseminación horizontal entre diferentes cepas y especies bacterianas, en algunos casos han sido reportados en el cromosoma, lo que puede conferir una resistencia más estable y heredable dentro de la población (Tavares-Carreon et al. 2023).

En el caso del CHL, un antibiótico de amplio espectro que inhibe la síntesis proteica bacteriana mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S, la resistencia en S. marcescens también está mediada por sistemas de expulsión de fármacos. Entre los genes cromosómicos involucrados en este mecanismo destacan SdeAB y Catb. El sistema SdeAB es una bomba de eflujo perteneciente a la familia de transportadores de eflujo RND (Resistance-Nodulation-Division), ampliamente distribuidos en bacterias gram-negativas y responsables de la resistencia a múltiples fármacos. Esta bomba expulsa CHL junto con otros antibióticos y compuestos tóxicos, disminuyendo su concentración intracelular y reduciendo su eficacia (Maseda et al. 2009). Por otro lado, el gen Catb codifica una cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), una enzima que modifica químicamente la molécula del antibiótico mediante la adición de grupos acetilo, impidiendo su unión al ribosoma y neutralizando su efecto antibacteriano (White et al. 1999). La presencia de Catb en el cromosoma de nuestra cepa de referencia sugiere que S. marcescens posee una resistencia innata al cloranfenicol, lo que podría reducir la efectividad de este antibiótico (Schwarz et al. 2004).

Resistencias en *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno versátil con una gran capacidad de adaptación a los antibióticos, lo que ha convertido su resistencia en un problema clínico significativo a nivel global (Rungelrath and DeLeo 2020). En particular, *S. aureus* ha demostrado múltiples mecanismos para evadir la acción de los aminoglucósidos y del FF empleados en esta investigación.

Uno de los mecanismos principales de resistencia a los aminoglucósidos en *S. aureus* es la modificación enzimática del antibiótico mediante transferasas, lo que impide que el fármaco ejerza su acción antibacteriana efectiva al evitar su unión al ribosoma bacteriano (Mlynarczyk-Bonikowska et al. 2022). Estas enzimas se sintetizan principalmente a partir de los genes aac(6')-Ie-aph(2")-Ia y aph(3')-IIIa, ampliamente distribuidos en cepas resistentes (Costa et al. 2021).

En cuanto a la resistencia a la florfenicol (FF), S. aureus la adquiere principalmente mediante la sobreexpresión de bombas de eflujo que eliminan activamente el antibiótico del interior de la célula, reduciendo su concentración intracelular por debajo de los niveles letales (Stephen et al. 2023). El principal gen asociado con este mecanismo es fexA, que codifica una bomba de eflujo capaz de expulsar distintos anfenicoles entre los que se encuentra el FF (Costa et al. 2021).

Sin embargo, en nuestras cepas de referencia no se ha detectado la presencia de los genes aac(6')-Ie-aph(2")-Ia, aph(3')-IIIa ni fexA, lo que sugiere que la resistencia observada podría estar mediada por otros mecanismos alternativos.

Resistencias en *Streptococcus agalactiae*

Finalmente *S. agalactiae* posee diversos mecanismos de resistencia contra los aminoglucósidos. Uno de los mecanismos más conocidos y ampliamente documentados es la inactivación enzimática de estos antibióticos, mediada por el gen aac(6')-aph(2"). Este gen codifica una bifuncional aminoglucósido N-acetiltransferasa y O-fosfotransferasa, una enzima que modifica químicamente los aminoglucósidos mediante procesos de acetilación y fosforilación, impidiendo su correcta unión al ribosoma y, por ende, neutralizando su acción bactericida (Liu et al. 2023).

Sin embargo, en nuestras cepas de referencia, no se ha detectado la presencia del gen aac(6')-aph(2"), lo que sugiere que la resistencia observada podría deberse a otros mecanismos alternativos. Entre estos mecanismos se encuentran la reducción de la permeabilidad de la membrana, lo que limita la entrada del antibiótico a la célula bacteriana, y la posible sobreexpresión de bombas de eflujo, que eliminan activamente los antibióticos del citoplasma antes de que alcancen su sitio de acción (Rojo-Bezares et al. 2016).

7.4.4.2 Efectos en la generación de resistencias por parte de la combinación de terpineol y antibióticos

Dado que TER tiene un bajo potencial para inducir resistencia bacteriana, es plausible que, en la terapia combinada, el principal factor generador de resistencia provenga del antibiótico con el que establece sinergia. Sin embargo, este efecto podría verse atenuado en cierta medida, ya que, en la sinergia con TER, la concentración del antibiótico utilizada es menor que su CIM, lo que reduce la presión selectiva ejercida sobre la población bacteriana. Además, el uso simultáneo de dos agentes con mecanismos de acción diferentes complica la evolución de la resistencia, ya que las bacterias deben desarrollar múltiples adaptaciones simultáneamente para evadir la acción de ambos compuestos. Esta estrategia ha sido ampliamente estudiada en el campo de la terapia combinada, donde se ha demostrado que la aplicación de múltiples antimicrobianos con blancos celulares distintos puede ralentizar significativamente la aparición de resistencia en comparación con el uso de un solo fármaco (Yi et al. 2022).

Se ha demostrado que numerosos compuestos naturales pueden inhibir mecanismos de resistencia, dificultando así la evolución de cepas resistentes y prolongando la eficacia de los antibióticos tradicionales. Un ejemplo de ello es el uso de Aloe vera en combinación con ceftiofur o cloxacilina, lo que ha demostrado retrasar la aparición de resistencia cromosómica en cepas de *S. aureus* (Chacón and Martíno 2019). Este fenómeno también ha sido descrito para distintos terpenos en diversas bacterias, particularmente en *S. aureus* (Dias et al. 2022, Mahizan et al. 2019). Aunque no se han realizado estudios específicos que confirmen este efecto para TER, la evidencia sugiere que su interacción con los antibióticos podría desempeñar un papel en la modulación de la resistencia bacteriana.

Por lo tanto, la explicación más probable es que, dado que el TER ha mostrado capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana celular y afectar el funcionamiento de bombas de eflujo bacterianas, su uso en combinación podría potenciar la acción de los antibióticos y reducir la capacidad de las bacterias para expulsarlos del interior celular. Además, algunos terpenos han demostrado inhibir directamente ciertas proteínas involucradas en la regulación de la resistencia bacteriana, lo que sugiere que la combinación de TER con antibióticos podría no solo mejorar la eficacia del tratamiento, sino también actuar como un modulador de la resistencia.

7.5 BLOQUE V: Ecotoxicidad de los productos naturales en combinación con antibióticos

A partir de los estudios combinatorios realizados en el bloque anterior, se identificaron cinco combinaciones entre el compuesto natural TER y distintos antibióticos comerciales que mostraron una actividad sinérgica destacada, lo que sugiere su potencial como estrategias terapéuticas más eficaces en comparación con el uso aislado de antibióticos. Estas combinaciones sinérgicas, denominadas SACTAs (Synergistic Antimicrobial Combinations of TER and Antibiotics), representan una contribución relevante a la búsqueda de soluciones que combinen eficacia antimicrobiana con sostenibilidad ambiental.

Las SACTAs identificadas son las siguientes:

1. SACTA 1: TER 125 µg/mL + GTM 3.9 µg/mL frente a *S. aureus* y *S. agalactiae*
2. SACTA 2: TER 62.5 µg/mL + GTM 3.9 µg/mL frente a *A. baumannii*
3. SACTA 3: TER 125 µg/mL + CHL 15.6 µg/mL frente a *S. marcescens*
4. SACTA 4: TER 125 µg/mL + TC 15.6 µg/mL frente a *S. marcescens*
5. SACTA 5: TER 62.5 µg/mL + FF 7.8 µg/mL frente a *S. aureus*

Dado el alto potencial terapéutico mostrado por estas combinaciones, se hace imprescindible evaluar su seguridad ambiental antes de considerarlas como alternativas viables. Este análisis permite dar cumplimiento al quinto y último objetivo específico de la tesis doctoral:

> **OBJETIVO V:** "Determinar la ecotoxicidad de las combinaciones más prometedoras que muestren una mejora en la actividad antimicrobiana"

Los resultados obtenidos en este bloque han sido recogidos en el artículo:

Valenzuela, A., Ballestero, D., Gan, C., Lorca, G., Langa, E., Pino-Otín, M., Synergistic Antimicrobial Combinations of Terpineol and Antibiotics: a safe alternative for the freshwater environment? STOTEN Submited

Este artículo presenta los resultados derivados de la evaluación ecotoxicológica de las combinaciones sinérgicas previamente identificadas, centrando el análisis en su efecto sobre organismos modelo acuáticos y comunidades microbianas naturales, de manera similar que se abordó en el Bloque 1 el estudio ecotoxicológico de los antibióticos. En particular, se llevaron a cabo bioensayos con *D. magna* y *A. fischeri*, en los que se analizó el efecto de las combinaciones sobre la mortalidad de los organismos expuestos, permitiendo así determinar su toxicidad aguda. Paralelamente, se analizó la respuesta funcional de comunidades microbianas acuáticas mediante el uso de placas Biolog EcoPlates™, lo que permitió obtener perfiles metabólicos detallados y detectar posibles alteraciones en la capacidad de procesamiento de distintos metabolitos.

El artículo completo puede consultarse en el **Anexo 5.1**.

7.5.1 Resumen

El desarrollo experimental realizado en este bloque representa la culminación del trabajo llevado a cabo a lo largo de la presente tesis doctoral, integrando de manera coherente las distintas líneas de investigación abordadas en fases previas.

Tras la identificación del TER como el compuesto natural más prometedor en función de su elevada actividad antimicrobiana y su bajo perfil de toxicidad ambiental, y una vez seleccionadas varias combinaciones sinérgicas con antibióticos sintéticos que demostraron una mejora significativa en la eficacia antimicrobiana, este último bloque se centra en evaluar el impacto sobre el medio ambiente de dichas combinaciones. En concreto, se aborda la caracterización de su toxicidad sobre organismos y comunidades microbianas acuáticas.

A través del desarrollo experimental realizado en esta fase, se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de la toxicidad aguda de las combinaciones sinérgicas identificadas, mediante la cuantificación precisa de la mortalidad inducida en organismos acuáticos modelo. Para ello, se emplearon bioensayos estandarizados con *D. magna* y *A. fischeri*, lo que permitió comparar los efectos tóxicos de cada mezcla frente a los generados por la administración individual de los compuestos implicados. Esta aproximación metodológica no solo facilitó la identificación de posibles efectos aditivos o incrementos no deseados de toxicidad en las formulaciones combinadas, sino que también proporcionó una base sólida para evaluar su seguridad ecológica.

De forma complementaria, se integró el análisis funcional de comunidades microbianas acuáticas naturales mediante el uso de Biolog EcoPlates™, lo que permitió detectar alteraciones en los patrones de utilización de fuentes de carbono y, por extensión, en la funcionalidad metabólica general de dichas comunidades. Este doble enfoque centrado tanto en los efectos letales sobre organismos individuales como en los impactos subletales sobre la funcionalidad microbiana permitió comprender de manera integral el riesgo ambiental asociado al uso de estas combinaciones, tal como se había procedido con los compuestos individuales.

El valor añadido de este bloque radica en su novedad y originalidad (no hay estudios previos similares en la literatura), así como la incorporación de una evaluación toxicológica detallada de combinaciones que previamente han demostrado una eficacia terapéutica significativamente aumentada. Esta integración de criterios de efectividad y seguridad ambiental permite avanzar hacia un modelo de intervención más equilibrado y sostenible, en el que la mejora del rendimiento antimicrobiano no se traduzca en un mayor riesgo ecológico. Al someter a análisis ecotoxicológico formulaciones con alto potencial clínico, se refuerza la solidez de las propuestas derivadas de este estudio y se sientan las bases para su eventual implementación en entornos reales.

De este modo, este bloque final no solo culmina el ciclo experimental desarrollado a lo largo de la tesis, sino que permite una valoración integral de las combinaciones más eficaces, considerando tanto su potencia antimicrobiana como su compatibilidad ambiental. La incorporación sistemática de criterios ecotoxicológicos en esta última fase del estudio refuerza el carácter multidisciplinar del enfoque adoptado y se alinea plenamente con los principios del marco "*One Health*", que reconoce la interdependencia entre la salud humana, animal y ambiental.

En este contexto, los resultados obtenidos respaldan la propuesta de soluciones antimicrobianas que no solo sean efectivas frente a patógenos relevantes, sino también responsables desde el punto de vista ecológico. Así, este bloque no solo cierra el itinerario experimental de la tesis, sino que también ofrece un modelo metodológico replicable, coherente con las demandas actuales de sostenibilidad en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

7.5.2 Información específica sobre material y métodos

En la primera parte del bloque se ha profundizado en el análisis de la toxicidad del TER y los antibióticos sobre los indicadores de agua *D. magna* y *A. fischeri*. Para ello se ha seguido la metodología descrita en el apartado 6.1, ampliando el tiempo de exposición en *D. magna* a 48h y empleado las siguientes concentraciones de cada uno de los compuestos (Tabla 26):

Tabla 26: Concentraciones de terpineol y antibióticos empleados en ensayos de toxicidad con organismos indicadores

Ensayo	Compuesto	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5
D. magna	SACTA 1, 2 y 3 (TER=125µg/mL)	0.0125%	12.5%	25%	50%	100%
	SACTA 4 y 5 (TER=62.5µg/mL)	0.25%	25%	50%	100%	200%
A. fischeri	SACTA 1, 2 y 3 (TER=125µg/mL)	0.0125%	12.5%	25%	50%	100%
	SACTA 4 y 5 (TER=62.5µg/mL)	0.25%	25%	50%	100%	200%
Comunidades microbianas	SACTA 1, 2 y 3 (TER=125µg/mL)	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-
	SACTA 4 y 5 (TER=62.5µg/mL)	0.1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	-	-

Elaboración propia.

El análisis de ecotoxicidad de las distintas sinergias también se ha realizado siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1. Al tratarse de una mezcla de compuestos, las concentraciones a probar se han estudiado en base a un porcentaje de las mismas, correspondiendo el 100% con la disolución original que ha presentado actividad antimicrobiana sinérgica. La tabla 27 recoge las concentraciones de cada antibiótico empleadas en cada uno de los ensayos realizados:

Tabla 27: Concentraciones de SACTAs empleadas en ensayos de toxicidad con organismos indicadores

Ensayo	SACTA	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5
D. magna	SACTA 1, 2 y 3 (TER=125µg/mL)	0.0125%	12.5%	25%	50%	100%
	SACTA 4 y 5 (TER=62.5µg/mL)	0.25%	25%	50%	100%	200%
A. fischeri	SACTA 1, 2 y 3 (TER=125µg/mL)	0.0125%	12.5%	25%	50%	100%
	SACTA 4 y 5 (TER=62.5µg/mL)	0.25%	25%	50%	100%	200%

Elaboración propia.

Por otro lado, el análisis de toxicidad de los SACTAs sobre las comunidades microbianas se ha llevado a cabo estudiando el comportamiento de cada componente de las SACTAs por separado a distintas concentraciones y de la combinación. La tabla 28 recoge las concentraciones empleadas:

Tabla 28: Concentraciones de SACTAs empleadas en ensayos de toxicidad con comunidades microbianas

SACTA	Concentración del Terpineol en SACTA (µg/mL)	Concentración del Antibiótico en SACTA (µg/mL)	MIC del Terpineol solo (µg/mL)	MIC del Antibiótico solo (µg/mL)	Concentración en combinación (µg/mL)
1	125	3.9	500	15.6	Terpineol 125 + Gentamicina 3.9
2	62.5	3.9	250	15.6	Terpineol 62.5 + Gentamicina 3.9
3	125	15.6	500	125	Terpineol 125 + Cloranfenicol 15.6
4	125	15.6	500	62.5	Terpineol 125 + Tetraciclina 15.6
5	62.5	7.8	500	31.25	Terpineol 62.5 + Florfenicol 7.8

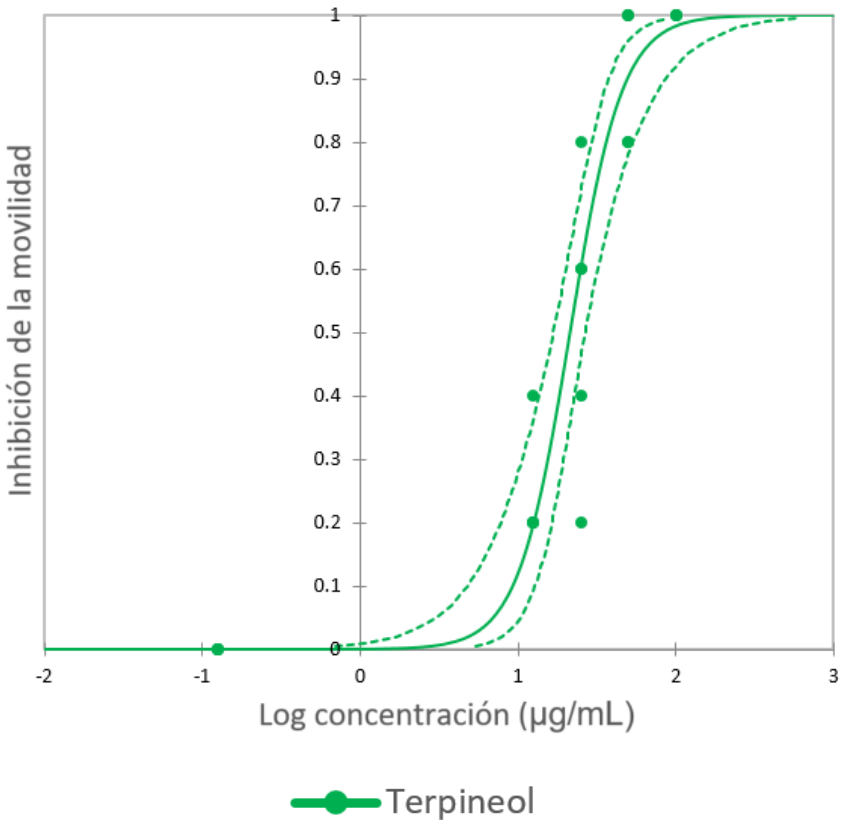
Elaboración propia.

7.5.3 Ecotoxicidad de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos sobre *D. magna*

7.5.3.1 Ecotoxicidad sobre *D. magna* del terpineol

La Figura 50 presenta la curva dosis-respuesta del TER en *D. magna* tras 48 horas de exposición. En esta gráfica, se observa la relación entre la concentración del compuesto y el efecto tóxico inducido en la población de organismos expuestos.

Figura 53: Toxicidad del terpineol sobre D. magna tras 48h de exposición



Curva dosis-respuesta para D. magna tras 48h de exposición a Terpineol Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

El valor de Lc_{50} obtenido en este caso es de 21.50 (16.71-26.70) µg/mL. Al comparar el valor con el obtenido en la sección 7.3.2 de la toxicidad del TER a las 24 horas, se observa un descenso de un 58.04% al pasar de 51.23 µg/mL a 21.50 µg/mL.

Al igual que en la evaluación realizada a las 24 horas, este es el primer registro documentado de la ecotoxicidad del TER en *D. magna* después de 48 horas de exposición. La ausencia de datos previos en la literatura destaca la relevancia de estos resultados para la comprensión del impacto ambiental de este compuesto.

Este comportamiento es común en estudios ecotoxicológicos y puede deberse a varios factores. En primer lugar, la acumulación del compuesto en los organismos expuestos puede incrementar su toxicidad con el tiempo. Además, el daño celular y las alteraciones metabólicas causadas por la sustancia pueden agravarse progresivamente, reduciendo la capacidad de los organismos para recuperarse y aumentando la mortalidad. Otro factor a considerar es la interferencia del compuesto con procesos biológicos esenciales, como la alimentación, la movilidad o la respiración, efectos que pueden volverse más letales con una exposición prolongada. Finalmente, en algunos casos, la degradación o transformación del compuesto en subproductos más tóxicos también puede contribuir a este aumento en la toxicidad (Teodorović et al. 2009, Pan et al. 2017, Kim et al. 2017b, Ghosh et al. 2024).

La tabla 29 recoge los valores de Lc_{50} del TER sobre *D. magna* después de 24 y 48 horas de exposición.

Tabla 29: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para el terpineol y los antibióticos empleados sobre los indicadores seleccionados

Compuesto	Lc_{50} *D. magna* 24h µg/mL (IC 95%)	Lc_{50} *D. magna* 48h µg/mL (IC 95%)	Lc_{50} *A. fischeri* 30min µg/mL (IC 95%)
Terpineol	51.23 (44.66-57.49)	21.50 (16.71-26.70)	17.65 (15.95-19.49)
Gentamicina	840.75 (742.70-927.24) (1)	687.04 (626.07-743.50)	>1000 (2)
Cloranfenicol	285.63 (235.12-333.92)(3)	157.04 (127.75-191.51) (4)	197.25 (171.57-225.51)(5)
Tetraciclina	391.07 (352.71-430.33)	232.93 (189.94-285.95)(6)	-*
Florfenicol	326.40 (263.50-406.30)	220.14 (176.79-274.02)(7)	>1000(8)

LC_{50} D. magna | *LC_{50} D. magna* | *LC_{50} A. fischeri*

(1) Lc_{50} (24h)= 875.5 µg/mL (Lomba et al. 2020)

(4) Lc_{50} (48h)= 372.4 µg/mL (Choi et al. 2008)
(4) Lc_{50} (48h)= 500 µg/mL (Czech, Jośko and Oleszczuk 2014)
(4) Lc_{50} (48h)= 1.086 µg/mL (Calleja et al. 1994)
(4) Lc_{50} (48h)= 227-600 µg/mL (Müller 1982)

(2) Lc_{50} (30min)= >10000 µg/mL (Lomba et al. 2020)

(3) Lc_{50} (24h)= 500 µg/mL (Czech et al. 2014)

(6) Lc_{50} (48h)= >340 µg/mL (Wollenberger et al. 2000)
(6) Lc_{50} (48h)= 90 µg/mL (Choi et al. 2008)
(6) Lc_{50} (48h)= >100 µg/mL (Sönmez and Sivri 2020)
(6) Lc_{50} (48h)= 816 µg/mL (Havelkova et al. 2016)

(5) Lc_{50} (15min)= 537.5 µg/mL (Choi et al. 2008)

(7) Lc_{50} (48h)= >100 µg/mL (Carraschi et al. 2011)

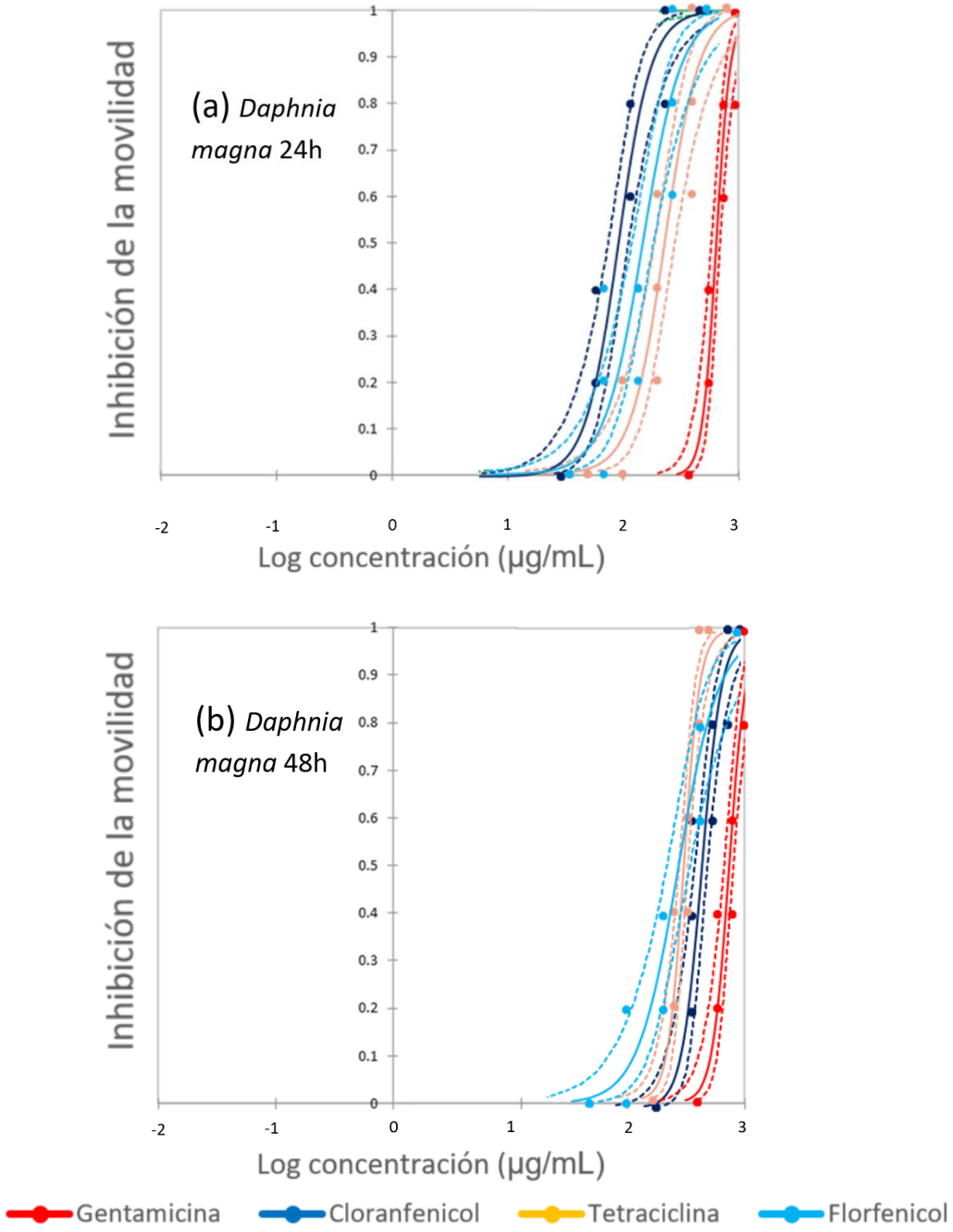
(8) Lc_{50} (30min)= 29.6 µg/mL (Kołodziejska et al. 2013)

** Dato no obtenido por incompatibilidad con el método utilizado*
Elaboración propia.

7.5.3.2 Ecotoxicidad sobre *D. magna* de los antibióticos

La Figura 54 presenta las curvas dosis-respuesta a las 24 horas (a) y 48 horas (b) para los antibióticos con los que el TER ha demostrado un comportamiento sinérgico en al menos una de las bacterias analizadas en esta investigación, según lo detallado en el Bloque IV.

Figura 54: Toxicidad de los antibióticos sobre D. magna tras 24 y 48h de exposición



Curva dosis-respuesta para D. magna tras 24 y 48h de exposición a Gentamicina, Cloranfenicol, Tetraciclina y Florfenicol Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

En la Tabla 29 se presentan los valores de Lc_{50} obtenidos en este estudio para cada antibiótico, junto con los valores de toxicidad documentados en investigaciones previas. Se observa una amplia variabilidad en los datos reportados en la literatura, lo que puede deberse a diferencias en las condiciones experimentales, el estado fisiológico de los organismos utilizados como bioindicadores o pureza de los antibióticos evaluados.

La toxicidad relativa de estos antibióticos, según el valor de Lc_{50} obtenido a las 24 horas de exposición, sigue el siguiente orden, de mayor a menor toxicidad: CHL > FF > TC > GTM. A las 48 horas, los valores de Lc_{50} se han reducido, pero se mantiene el mismo patrón, lo que indica que la toxicidad de estos antibióticos es dependiente del tiempo de exposición, pero el patrón de sus efectos adversos en los organismos analizados no varía.

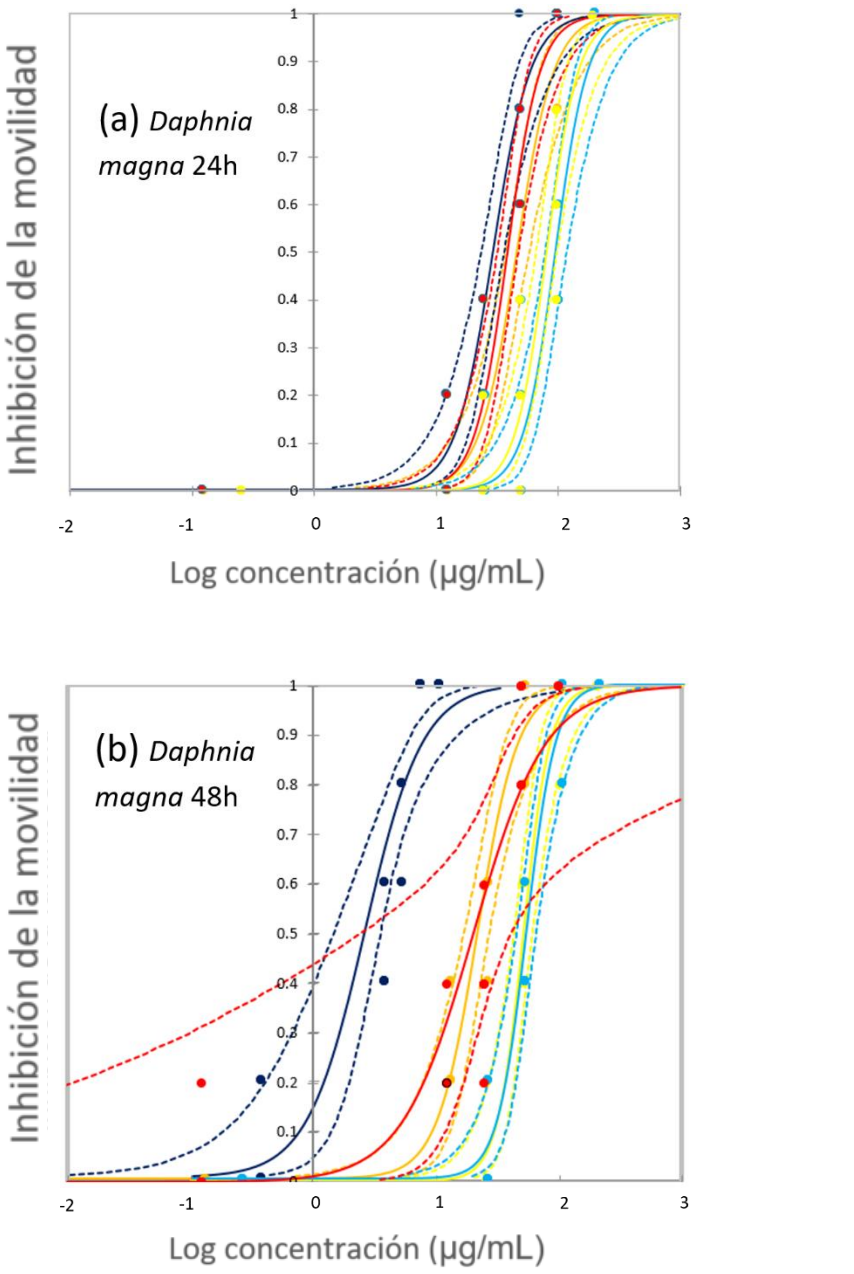
Los cuatro antibióticos estudiados tienen un amplio espectro de actividad contra bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, y todos ellos se unen a los ribosomas bacterianos (GTM y TC a la subunidad 30S, y CHL y FF a la subunidad 50S), inhibiendo la síntesis de proteínas, aunque a través de mecanismos ligeramente diferentes: CHL bloquea la formación de enlaces peptídicos durante la traducción, GTM induce errores en la traducción del ARNm, TC impide la unión del ARN de transferencia (ARNt) al complejo ribosomal y FF bloquea la translocación, interfiriendo con el movimiento del ribosoma a lo largo del ARNm y el correcto ensamblado de proteínas (Kapoor, Saigal and Elongavan 2017, Zhang et al. 2008).

7.5.3.3 Ecotoxicidad sobre *D. magna* de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos

A partir de los datos obtenidos en los experimentos se generaron curvas de toxicidad con el objetivo de calcular los valores de Lc_{50} de los SACTAs en porcentaje, permitiendo así una comparación visual y directa de su ecotoxicidad en la Figura 52 para este bioindicador.

Posteriormente, para facilitar la comparación de los resultados de los SACTAs con los compuestos originales, los valores de Lc_{50} obtenidos en porcentaje fueron convertidos a µg/mL considerando las concentraciones iniciales de las soluciones utilizadas en el estudio (Tabla 30). Tras 48 horas de exposición, la toxicidad para *D. magna*, expresada en µg/mL, se ordenó de mayor a menor de la siguiente manera: SACTA 3 > SACTA 1 ≈ SACTA 4 > SACTA 2 ≈ SACTA 5. Este orden sugiere que SACTA 3 presenta el efecto más perjudicial sobre *D. magna*, mientras que SACTA 2 y SACTA 5 muestran una menor toxicidad en comparación con el resto.

Figura 55: Toxicidad de las SACTAs sobre D. magna tras 24 y 48h de exposición



Curva dosis-respuesta para D. magna después de 24 h (a) y 48 h (b) de exposición a SACTA 1 (Terpineol 125 µg/mL + Gentamicina 3.9 µg/mL), SACTA 2 (Terpineol 62.5 µg/mL + Gentamicina 3.9 µg/mL), SACTA 3 (Terpineol 125 µg/mL + Cloranfenicol 15.6 µg/mL), SACTA 4 (Terpineol 125 µg/mL + Tetraciclina 15.6 µg/mL), SACTA 5 (Terpineol 62.5 µg/mL + Florfenicol 7.8 µg/mL). La línea sólida representa el promedio de los valores experimentales (puntos), mientras que las líneas discontinuas indican el intervalo de confianza del 95%. Elaboración propia.

Tabla 30: Valores de toxicidad experimentales y bibliográficos para las SACTAs empleadas sobre los indicadores seleccionados

Nº SACTA[a]	SACTA[a] (µg/mL)	LC_{50} *D. magna* 24h % (IC 95%)	LC_{50} *D. magna* 24h µg/mL (IC 95%)	LC_{50} *D. magna* 48h % (IC 95%)	LC_{50} *D. magna* 48h µg/mL (IC 95%)	Efecto en toxicidad	LC_{50} *A. fischeri* 30min % (IC 95%)	LC_{50} *A. fischeri* 30min µg/mL (IC 95%)	Efecto en toxicidad
1	TER 125 + GTM 3.9	38.74 (31.85-47.49)	48.42 (39.81-59.36) + 1.51 (1.24-1.85)	20.555 (12.805-28.445)	25.70 (16.01-35.56) + 0.80 (0.50 + 1.11	Adición	38.78 (36.79-34.00)	48.47 (45.98-42.50) + 1.51 (1.43-1.33)	/
2	TER 62.5 + GTM 3.9	94.95 (78.23-117.47)	59.34 (48.89-73.42) + 3.70 (3.05-4.58)	50.589 (42.340-60.242)	31.62 (26.47-37.65) + 1.9 (1.65-2.35)	Antagonismo	67.12 (61.41-72.85)	41.95 (38.38-45.53) + 2.62 (2.39-2.84)	/
3	TER 125 + CHL15.6	29.89 (24.08-37.00)	37.36 (30.10-46.25) + 4.66 (3.76-5.77)	6.272 (2.002-11.440)	7.84 (2.50-14.30) + 0.98 (0.31+1.78)	Sinergia	10.20 (8.77-11.77)	12.75 (10.96-14.72) + 1.59 (1.37-1.84)	Sinergia
4	TER 125 + TC 15.6	46.52 (37.73-58.82)	58.15 (47.16-73.53) + 7.26 (5.89-9.18)	20.861 (16.180-25.885)	26.08 (20.22-32.36) + 3.25 (2.52-4.04)	Adición	-[b]	-[b]	-[b]
5	TER 62.5 + FF 7.8	82.05 (67.61-100.47)	51.28 (43.26-62.80) + 6.40 (5.27+7.84)	51.959 (43.048-62.472)	32.47 (26.90-39.04) + 4.05 (3.36-4.87)	Antagonismo	59.90 (54.12-65.71)	37.44 (33.82-41.07) + 4.67 (4.22-5.13)	/

a) Synergistic Antimicrobial Combinations of TER and Antibiotics

b) Dato no obtenido por incompatibilidad con el método utilizado

Elaboración propia.

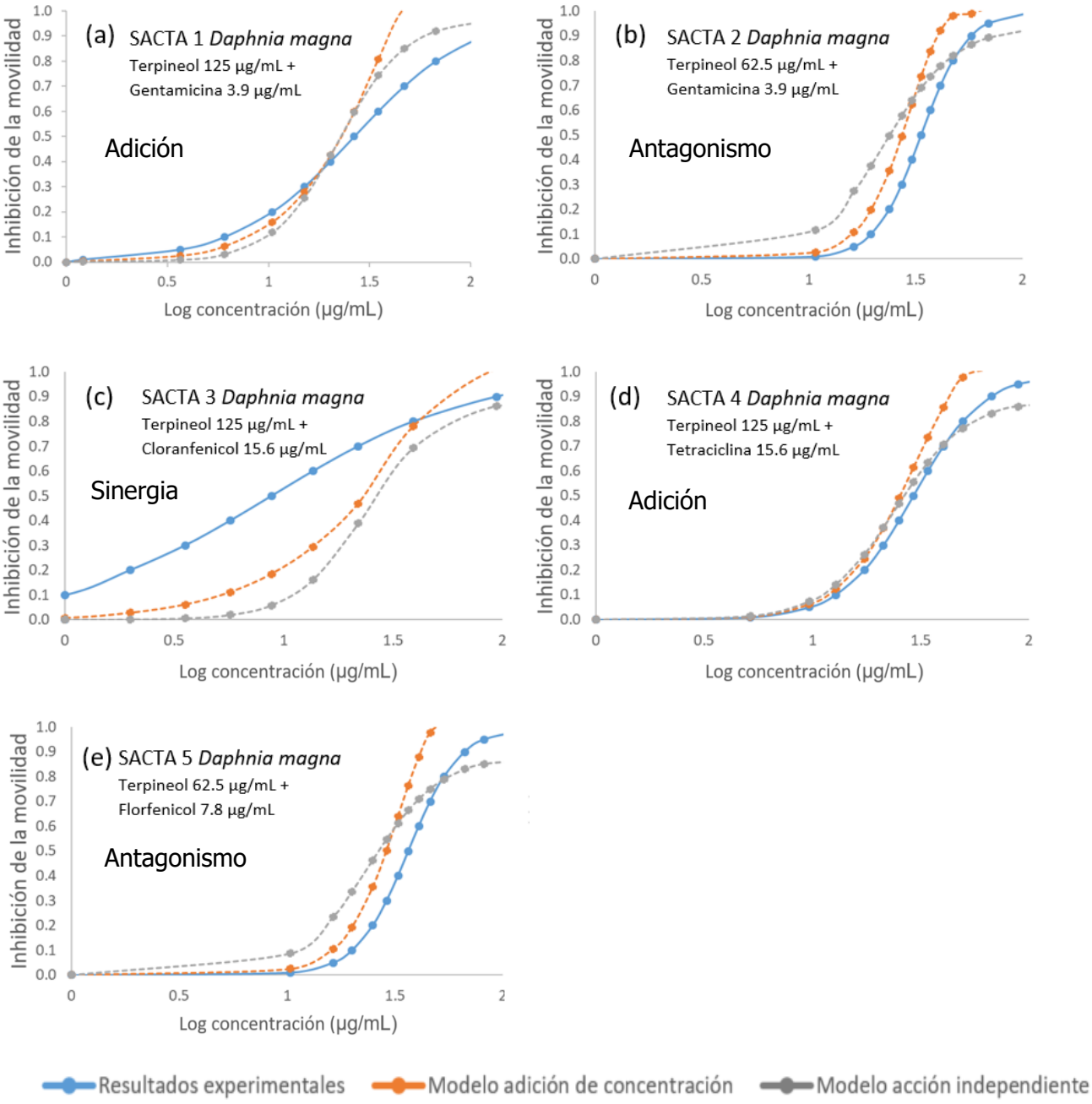
Los resultados evidencian que los SACTAs presentan diferentes niveles de toxicidad, dependiendo del antibiótico utilizado en su formulación. En particular, la combinación que incluye CHL mostró ser la más tóxica para este bioindicador, lo que concuerda con la alta toxicidad intrínseca de CHL cuando se evaluó como antibiótico individual, como se discutió en la sección anterior.

Por otro lado, las formulaciones que contienen FF y GTM, las cuales presentan concentraciones más bajas de TER en comparación con las demás, mostraron menor toxicidad. Esto pone de manifiesto el papel del TER como un factor clave en la toxicidad global de los SACTAs, ya que su presencia en mayores concentraciones parece correlacionarse con un aumento en la toxicidad observada.

Al comparar los valores de Lc_{50} (µg/mL) de los SACTAs con los valores obtenidos para los antibióticos individuales (ver Tablas 29 y 30), se evidencia que las combinaciones presentan una mayor toxicidad en comparación con los antibióticos aislados. Sin embargo, estos valores de Lc_{50} se mantienen dentro del rango de toxicidad del TER solo, lo que sugiere que la principal fuente de toxicidad en las combinaciones es probablemente el TER, y que su presencia dentro de los SACTAs es el factor predominante en la disminución de la viabilidad de los bioindicadores.

Dado que estos cinco SACTAs fueron seleccionados en función de su actividad antimicrobiana sinérgica, se esperaba que sus combinaciones también generaran un efecto sinérgico en términos de toxicidad. Sin embargo, los resultados obtenidos reflejan un patrón complejo de interacciones, lo que sugiere que la toxicidad de los SACTAs no depende únicamente de la suma de sus componentes, sino de posibles efectos combinados que pueden variar en función del tipo de antibiótico utilizado y las concentraciones relativas de cada compuesto. La figura 56 muestra la comparativa entre los resultados experimentales y las predicciones realizadas en *D. magna*:

Figura 56: Comparación entre resultados experimentales y predicciones del modelo en curvas dosis-respuesta para D. magna



Comparación entre los resultados experimentales y las predicciones del modelo de la curva dosis-respuesta para D. magna después de 48 h de exposición a SACTA 1 (Terpineol 125 µg/mL + Gentamicina 3.9 µg/mL) (a), SACTA 2 (Terpineol 62.5 µg/mL + Gentamicina 3.9 µg/mL) (b), SACTA 3 (Terpineol 125 µg/mL + Cloranfenicol 15.6 µg/mL) (c), SACTA 4 (Terpineol 125 µg/mL + Tetraciclina 15.6 µg/mL) (d) y SACTA 5 (Terpineol 62.5 µg/mL + Florfenicol 7.8 µg/mL) (e). La línea sólida representa los resultados experimentales, mientras que las líneas discontinuas indican las predicciones del modelo. Elaboración propia.

Los estudios de toxicidad previamente documentados en la literatura sobre combinaciones de dos antimicrobianos, utilizando *D. magna* como organismo indicador individual, han demostrado que pueden producirse efectos tóxicos complejos, que no se limitan únicamente a efectos aditivos, sino que también pueden incluir sinergias y antagonismos, dependiendo de los mecanismos de acción combinados de los compuestos involucrados.

Sin embargo, estas interacciones complejas no se limitan exclusivamente a combinaciones de antibióticos, sino que también han sido reportadas en mezclas de antimicrobianos con otros tipos de sustancias químicas. Por ejemplo, se ha demostrado que los compuestos organoestánnicos pueden interferir con la toxicidad de otros contaminantes, alterando la respuesta biológica de los organismos expuestos (Kungolos et al. 2004). Del mismo modo, estudios han evidenciado que nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) y óxido de cobre (CuO) pueden modificar la toxicidad de ciertos antibióticos, lo que sugiere que estos nanomateriales pueden actuar como cofactores en procesos de toxicidad sinérgica o antagónica (Heinlaan et al. 2008).

Además, la exposición combinada a múltiples antibióticos, fármacos y productos fitosanitarios puede incrementar significativamente la toxicidad, incluso cuando los compuestos individuales están presentes en concentraciones bajas (Cedergreen et al. 2006, Hernando et al. 2003, Srain, Beazley and Walker 2020). Este fenómeno es particularmente relevante en entornos acuáticos contaminados, donde los organismos expuestos a mezclas de contaminantes pueden experimentar efectos adversos no previstos al evaluar cada sustancia por separado.

SACTAs que han mostrado un comportamiento sinérgico en *D. magna*:

El único comportamiento sinérgico detectado en *D. magna* se observa en la combinación de SACTA 3 formada por TER y CHL, siendo esta la mezcla más tóxica analizada.

En la Figura 56c, se puede observar que los modelos predictivos estiman una toxicidad esperada inferior a la que se detectó experimentalmente en *D. magna*. Esta discrepancia sugiere la presencia de mecanismos de interferencia adicionales que potencian la toxicidad en esta combinación específica, diferenciándola de otras interacciones evaluadas en el estudio.

Estudios previos han demostrado que las mezclas de productos antimicrobianos pueden generar interacciones complejas que modifican los mecanismos de acción tóxica de cada compuesto, lo que puede traducirse en un aumento significativo de la ecotoxicidad en *D. magna.* En particular, se ha observado que las combinaciones de antibióticos más tóxicas para este bioindicador son aquellas que incluyen CHL (Zhang et al. 2021b), lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

Pese a que la acción primaria del CHL está dirigida a bacterias, este antibiótico también puede generar efectos adversos en organismos eucariotas, como *D. magna*, debido a su capacidad para interferir en procesos celulares esenciales. Se ha documentado que el CHL puede inducir estrés oxidativo, efectos negativos en la reproducción, citotoxicidad y bioacumulación, lo que lo convierte en un compuesto de especial preocupación en ecosistemas acuáticos.

Estudios previos han demostrado que exposiciones agudas a CHL pueden provocar daño tisular significativo en este bioindicador. En particular, tras 24 horas de exposición a concentraciones subletales, se han observado altos niveles de estrés oxidativo en las células, lo que indica que el CHL interfiere con los mecanismos antioxidantes del organismo y genera un desequilibrio metabólico que compromete su viabilidad (Zhang et al. 2021c). Además, este antibiótico presenta una alta capacidad de bioacumulación, acumulándose en los tejidos de *D. magna* a lo largo del tiempo, lo que prolonga sus efectos tóxicos incluso después de la exposición inicial (Zhang et al. 2018d). Además, en exposiciones prolongadas de 21 días, se han reportado graves alteraciones en la reproducción de *D. magna*, incluyendo reducción de la fecundidad, retrasos en el desarrollo y disminución en la tasa de supervivencia de la descendencia (Czech et al. 2014). Estos efectos pueden atribuirse a la interferencia del CHL en la síntesis proteica y su capacidad para inducir alteraciones metabólicas que afectan la homeostasis del organismo.

El impacto negativo del CHL podría verse potenciado por su combinación con TER gracias a la capacidad de este producto natural para atravesar barreras biológicas y aumentar el estrés oxidativo. La interacción entre ambos compuestos podría explicar el efecto sinérgico observado, en el cual la toxicidad combinada es mayor de lo esperado en función de sus efectos individuales. Aunque no existe literatura previa concreta, se ha demostrado que el aumento del estrés oxidativo inducido en *D. magna* es aún más pronunciado cuando los antibióticos se combinan con otros contaminantes ambientales,

como microplásticos (Zhang et al. 2019c) o ciertos compuestos químicos específicos (Liu et al. 2018). Además, en el caso de este cladócero, su estrategia de alimentación basada en filtración activa podría exacerbar los efectos de permeabilidad inducidos por la combinación CHL-TER, ya que este mecanismo facilita la ingesta y acumulación de contaminantes presentes en el medio acuático (Tkaczyk et al. 2021).

SACTAs que han mostrado un comportamiento antagónico en *D. magna*:

Las Figuras 56b y 56e muestran los efectos de la exposición de *D. magna* a SACTA 2 y SACTA 5, formulaciones que contienen GTM y FF, respectivamente. En ambos casos, se observa que la toxicidad predicha por los modelos es mayor que la toxicidad observada experimentalmente, lo que sugiere la presencia de una interacción antagónica entre los componentes de estas combinaciones.

Además, en la Tabla 28 y 29, se presentan las Lc_{50} de cada SACTA y de los componentes en las combinaciones que mostraron sinergia, permitiendo una comparación detallada entre ellos.

GTM es un compuesto polar con una alta hidrofilia que le impide atravesar fácilmente las membranas celulares. Estas propiedades explican por qué *D. magna* requiere concentraciones tan altas de gentamicina en el agua para experimentar efectos tóxicos directos: la sustancia permanece disuelta en el agua y penetra pobremente en el organismo, limitando su toxicidad aguda. Sin embargo, la GTM al ser un antibiótico de amplio espectro que inhibe la síntesis proteica en procariotas tiene el potencial de diezmar las bacterias benéficas en el intestino de *Daphnia* y en el agua circundante, lo que puede afectar a sus funciones vitales (Fernandez et al. 2021).

Por otro lado, el FF posee un peso molecular relativamente bajo, lo que le permite difundirse pasivamente a través de la bicapa lipídica de las células. Su moderada lipofilicidad le confiere la capacidad de disolverse tanto en medios lipídicos como acuosos, lo que facilita su distribución en los organismos expuestos. Esta alta permeabilidad podría explicar sus efectos tóxicos en *D. magna*, los cuales pueden potenciarse aún más por la ingestión activa del compuesto durante su proceso de alimentación por filtración.

Según la literatura, el FF está asociado con múltiples efectos adversos en este bioinidcador, entre los que se encuentra un aumento del estrés oxidativo causado por un impacto negativo en el equilibrio redox celular (Zhang et al. 2018d). Además, se han documentado efectos tóxicos sobre la reproducción, manifestados en la reducción de la fecundidad y alteraciones en el desarrollo, lo que puede comprometer la viabilidad de las poblaciones expuestas (Martins, Guimarães and Guilhermino 2013). Adicionalmente, algunos estudios han sugerido que el FF podría afectar al microbioma intestinal, lo que podría repercutir en la eficiencia digestiva y el metabolismo del organismo; y a la función mitocondrial y el sistema endocrino, lo que implicaría una alteración en la producción de energía y en la regulación hormonal (Li et al. 2018).

Cuando GTM y FF se combinan con TER, pueden ocurrir diversos mecanismos que expliquen el efecto antagónico observado en la toxicidad de la mezcla. Uno de los factores clave es la posibilidad de interacciones físico-químicas entre los compuestos, que podrían reducir la biodisponibilidad de TER en el medio acuoso y, en consecuencia, disminuir su toxicidad. Como aminoglucósido, GTM tiene la capacidad de formar interacciones químicas o físicas con otros compuestos, como TER, lo que puede alterar la solubilidad o estabilidad de este último en la solución.

Aunque, hasta la fecha, no existen estudios específicos que analicen la formación de complejos entre GTM, FF y TER, se han documentado interacciones similares en combinaciones de antibióticos con otros compuestos químicos. Por ejemplo, se ha reportado que ciertos aminoglucósidos pueden formar enlaces con moléculas orgánicas y agentes quelantes, lo que disminuye su eficacia antimicrobiana y su toxicidad en el ambiente acuático (Lesniak, Pecoraro and Schacht 2005).

Además, la presencia de GTM y FF podría inducir la activación de mecanismos de biotransformación en los organismos expuestos, lo que alteraría el metabolismo de TER, reduciendo su toxicidad. En este contexto, *D. magna* y otros organismos acuáticos poseen enzimas metabólicas especializadas que pueden modificar compuestos xenobióticos, transformándolos en metabolitos menos tóxicos o más fácilmente excretables. Aunque no se dispone de información específica sobre la biotransformación de TER en combinación con GTM o FF, se han documentado fenómenos similares en estudios sobre la toxicidad de mezclas de pesticidas y otros contaminantes ambientales. Por ejemplo, en el caso de los pesticidas, se ha observado que el antagonismo puede ser causado por la inhibición enzimática, lo que ralentiza la conversión de los compuestos

en sus formas más tóxicas, reduciendo así el efecto combinado de ambas sustancias en *D. magna* (Cedergreen et al. 2006, Rider and LeBlanc 2005). Este mismo principio podría aplicarse a la interacción entre TER, GTM y FF, donde los organismos expuestos podrían estar metabolizando estos compuestos de manera diferente cuando se administran en combinación, disminuyendo la toxicidad final del TER en el medio biológico.

SACTAs que han mostrado un comportamiento aditivo en *D. magna*:

Este fenómeno se observa en *D. magna* expuesta a SACTA 1 y SACTA 4, formulaciones que contienen GTM y TC respectivamente. Como se ilustra en las Figuras 56a y 56d, los modelos predictivos de toxicidad se alinean con los datos experimentales, lo que indica la ausencia de interacción entre los mecanismos de acción de ambas sustancias. Esto sugiere que el efecto observado responde a un modelo aditivo, es decir, la toxicidad total corresponde a la suma de los efectos individuales de cada compuesto, sin que se produzca sinergia o antagonismo.

En la Figura 56a (SACTA 1), los datos experimentales revelan una toxicidad ligeramente menor a la estimada por los modelos. No obstante, un análisis detallado de los valores de Lc_{50} a las 48 horas para *D. magna* (Tabla 29) muestra que los intervalos de confianza se superponen con los valores predichos, lo que sugiere que esta diferencia es estadísticamente no significativa. En consecuencia, se puede concluir que la toxicidad de la combinación sigue un efecto netamente aditivo, sin indicios de interacciones que modifiquen el impacto de los compuestos cuando se administran simultáneamente.

Al igual que en el caso de GTM, TC tiene un tamaño molecular relativamente pequeño (ver Tabla 9), lo que les permite ingresar a células eucariotas mediante difusión pasiva, afectando a organismos acuáticos como *D. magna*. Esta capacidad de penetración se debe en gran parte a su estructura anfipática, la cual le permite atravesar membranas celulares ricas en lípidos. Además, su pKa le permite existir en forma neutra o parcialmente cargada a pH fisiológico, facilitando así su difusión a través de las bicapas lipídicas de las células.

Otro aspecto relevante de la TC es su capacidad para formar complejos con cationes bivalentes, como magnesio (Mg^{2+}) y calcio (Ca^{2+}). Esta interacción puede influir en su unión a proteínas de transporte, modificando su biodisponibilidad y su transporte a través de ciertas barreras celulares (Carlotti, Cesaretti and Elisei 2012).

Asimismo, las células eucariotas poseen proteínas transportadoras especializadas que regulan el movimiento de diversas moléculas, incluidas las tetraciclinas. Un ejemplo de ello son los transportadores de aniones orgánicos (OATs), los cuales desempeñan un papel clave en la captación de TC en tipos celulares específicos. Estos transportadores pueden facilitar la entrada del antibiótico en células sensibles, lo que podría intensificar su toxicidad en organismos acuáticos y contribuir a su bioacumulación en tejidos expuestos (Kobayashi et al. 2005).

En este sentido, se ha demostrado que la bioacumulación de TC en *D. magna* ocurre principalmente a través de la absorción acuosa, en mayor medida que por ingestión dietética. Esto sugiere que el mecanismo de captación de TC en estos organismos es más eficiente a través del contacto directo con el medio acuático. Además, se ha observado que TC afecta la microbiota intestinal de *D. magna*, lo que podría tener implicaciones en su homeostasis energética y en su capacidad para metabolizar nutrientes esenciales (Kim et al. 2014).

Estudios de exposición multigeneracional han evidenciado que TC induce respuestas transcripcionales asociadas al estrés en D. magna, afectando funciones celulares clave. Estas alteraciones incluyen impactos en la traducción de proteínas, el metabolismo de carbohidratos y proteínas, y la fosforilación oxidativa, lo que sugiere que la exposición prolongada a TC puede generar efectos a nivel metabólico y energético en las poblaciones de daphnias (Kim et al. 2017a).

Otros estudios han demostrado estos efectos aditivos en mezclas de antimicrobianos. Un ejemplo representativo de este fenómeno se encuentra en la combinación de triclosán y triclocarbán. En este caso, los resultados indicaron que la toxicidad observada en la mezcla coincidió estrechamente con los valores predichos por los modelos, lo que sugiere la ausencia de interacciones significativas entre los mecanismos de acción de ambos compuestos (Villa, Vighi and Finizio 2014).

7.5.4 Ecotoxicidad de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos sobre *A. fischeri*

7.5.4.1 Ecotoxicidad sobre *A. fischeri* del terpineol

La Figura 33 presentada en la sección 7.3.3 muestra la curva dosis-respuesta de *A. fischeri* tras 30 minutos de exposición a TER.

El valor de Lc_{50} obtenido en este estudio es de 17.65 µg/mL (15.95-19.49 µg/mL). Al igual que en la evaluación realizada en *D. magna*, este estudio representa el primer registro documentado sobre la ecotoxicidad del TER en *A. fischeri*.

La tabla 23 y la tabla 30 recogen los valores del Lc_{50} del TER sobre esta bacteria tras 30 minutos de exposición.

7.5.4.2 Ecotoxicidad sobre *A. fischeri* de los antibióticos

La figura 57 muestra la curva dosis respuesta obtenida tras la exposición de CHL durante 30 minutos sobre *A. fischeri.*

De los cuatro antibióticos que han mostrado un comportamiento sinérgico con el TER, únicamente se ha logrado obtener y representar la curva dosis-respuesta para el CHL.

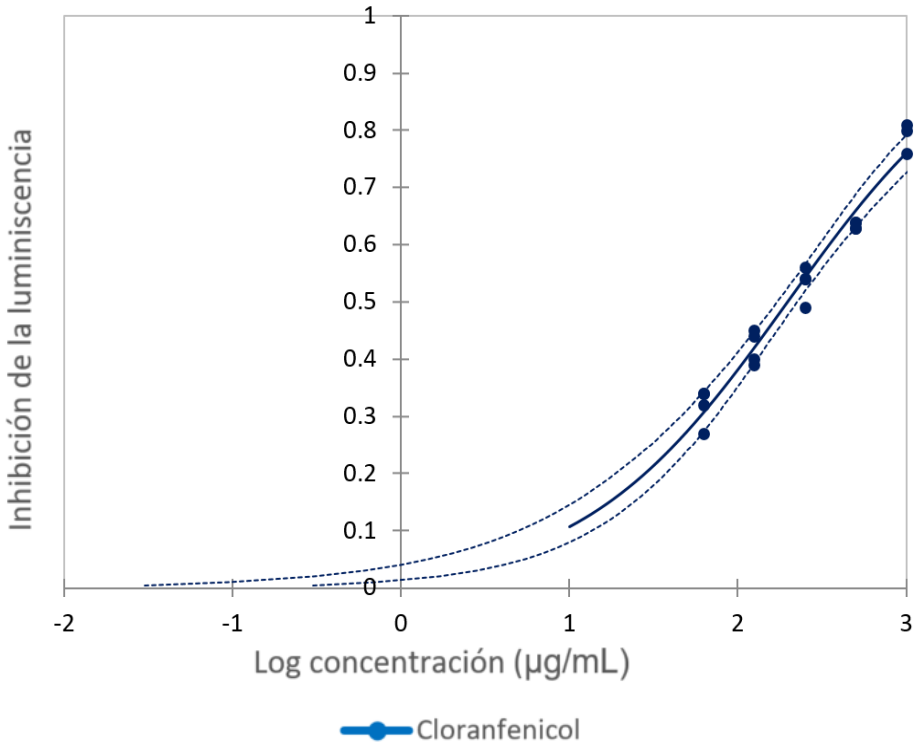
En el caso de GTM y de FF, los valores de toxicidad obtenidos superaron los 1000 µg/mL, lo que indica una toxicidad muy baja dentro del rango de concentración evaluado. Debido a esta baja respuesta tóxica, no se han representado sus respectivas curvas dosis-respuesta.

Por otro lado, la TC presentó interferencia colorimétrica en la medición de luminiscencia en *A. fischeri*, lo que impidió la obtención de datos confiables en el ensayo.

En la Tabla 28 se presentan los valores de Lc_{50} obtenidos en este estudio para cada antibiótico, así como los valores de toxicidad previamente documentados en la literatura, permitiendo una comparación directa entre ambos. Se observa una amplia variabilidad en los datos reportados en estudios previos, un patrón que también fue

identificado en el caso de *D. magna*. Estas diferencias pueden atribuirse a diversos factores entre los que destacan los distintos tiempos de exposición a los compuestos.

Figura 57: Toxicidad del cloranfenicol sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición



Curva dosis-respuesta para A. fischeri tras 30 minutos de exposición a Cloranfenicol. Los puntos representan los valores experimentales, la línea continua la curva de toxicidad y las líneas discontinuas los límites de confianza al 95%. Elaboración propia.

Pese a las diferencias observadas, los resultados obtenidos se alinean con las tendencias generales documentadas en investigaciones previas, lo que refuerza la validez y reproducibilidad de los datos presentados.

El efecto del CHL sobre *A. fischeri* puede explicarse por su elevada lipofilicidad (Log Kow) y su solubilidad en agua (ver Tabla 9), propiedades que favorecen su difusión a través de la membrana externa y la membrana celular. Estas características permiten que el CHL se desplace con facilidad por el citoplasma bacteriano hasta alcanzar su objetivo ribosomal, donde interfiere con la síntesis proteica. En bacterias gram-negativas como *Aliivibrio*, su eficacia puede potenciarse aún más debido a su capacidad para cruzar la membrana externa mediante porinas y a su eficiente activación intracelular.

La importancia de las porinas en la entrada del CHL ha sido ampliamente documentada. Estudios han demostrado que la reducción en la expresión de estas proteínas en bacterias como *Haemophilus influenzae* (Burns and Smith 1987) o mutaciones que afectan su presencia en *Klebsiella* (Gutmann et al. 1985) disminuyen significativamente la permeabilidad al CHL. La presencia de porinas facilita el transporte del CHL a través de la barrera externa de la bacteria, un mecanismo crucial para su eficacia en organismos gram-negativos, donde la membrana externa suele representar una barrera protectora contra muchas moléculas antimicrobianas.

Además, diversas modificaciones químicas en la estructura del CHL pueden influir en su eficacia antibacteriana. Se ha observado que la incorporación de ciertos grupos funcionales, como el diglicina, acelera la activación del CHL una vez dentro de la célula bacteriana, aumentando su capacidad bacteriostática en gram-negativos (Wang et al. 2019b).

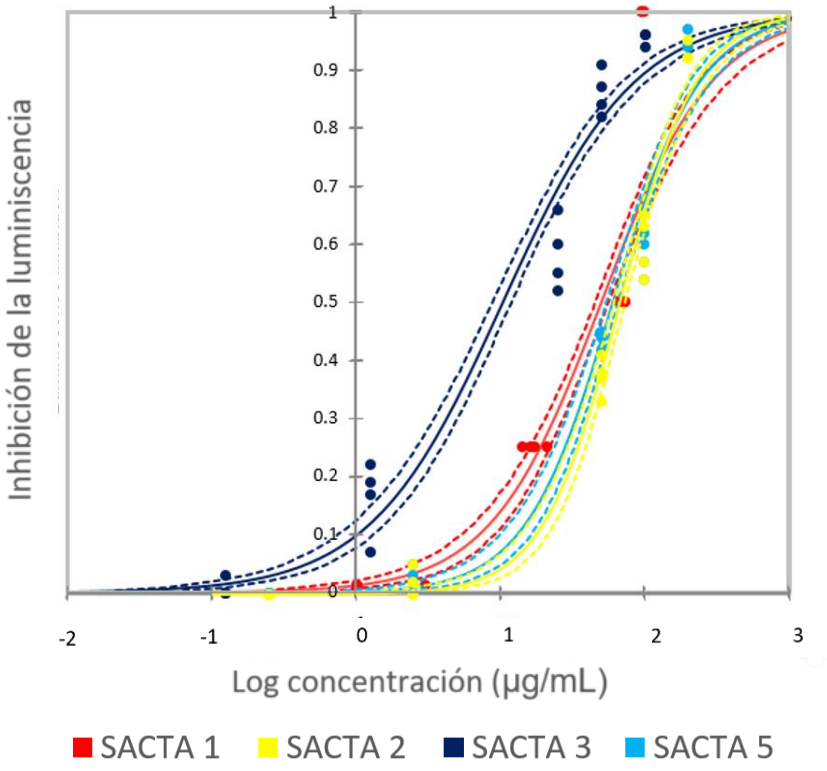
7.5.4.3 Ecotoxicidad sobre *A. fischeri* de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos

Siguiendo el mismo enfoque aplicado en el tratamiento de los datos de *D. magna*, se elaboraron curvas de toxicidad con el objetivo de calcular los valores de Lc_{50} de los SACTAs en porcentaje, lo que permite realizar una comparación visual y directa de su ecotoxicidad en la Figura 58 para este bioindicador.

Posteriormente, para facilitar la comparación entre los resultados de los SACTAs y los compuestos originales, los valores de Lc_{50} inicialmente expresados en porcentaje fueron convertidos a µg/mL. Esta conversión se realizó tomando como referencia las concentraciones iniciales de las soluciones utilizadas en el estudio (Tabla 29). Después de los 30 minutos de exposición, la toxicidad de las SACTAs sobre esta bacteria, expresada en µg/mL y ordenada de mayor a menor es: SACTA 3 > SACTA 5 > SACTA 2 > SACTA 1.

De nuevo, al igual que ocurría en *D. magna,* la combinación que incluye CHL mostró los mayores niveles de toxicidad, y aquella que presenta GTM y TER a concentraciones más bajas (SACTA 1) mostró la menor toxicidad de todas las evaluadas.

Figura 58: Toxicidad de las SACTAs sobre A. fischeri tras 30 minutos de exposición

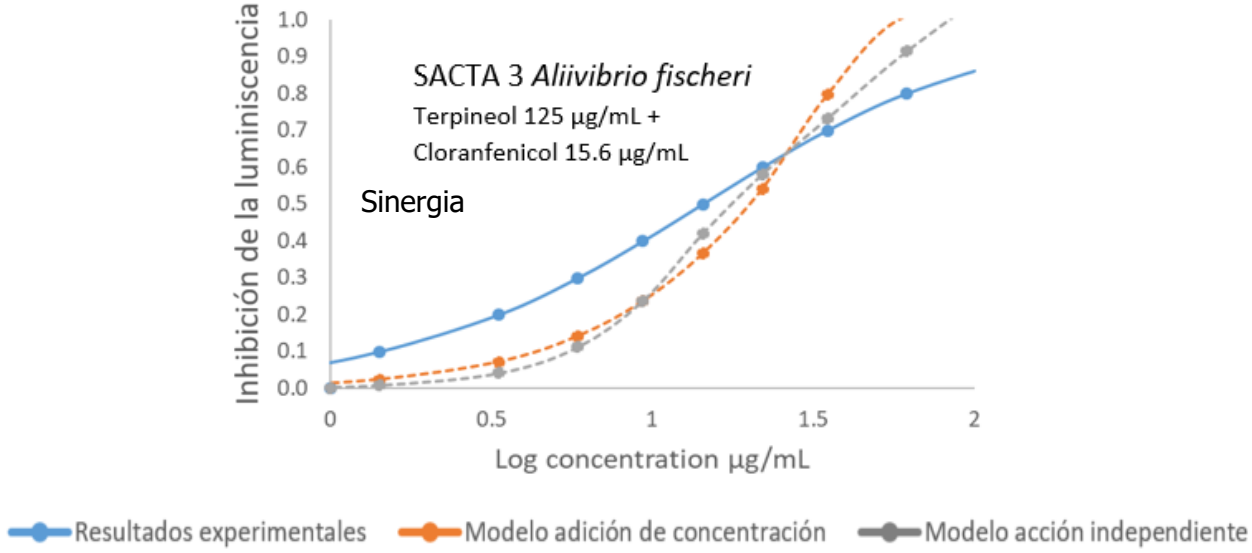


Curva dosis-respuesta para D. magna *después de 30 minutos de exposición a SACTA 1 (Terpineol 125 µg/mL + Gentamicina 3.9 µg/mL), SACTA 2 (Terpineol 62.5 µg/mL + Gentamicina 3.9 µg/mL), SACTA 3 (Terpineol 125 µg/mL + Cloranfenicol 15.6 µg/mL) y SACTA 5 (Terpineol 62.5 µg/mL + Florfenicol 7.8 µg/mL). La línea sólida representa el promedio de los valores experimentales (puntos), mientras que las líneas discontinuas indican el intervalo de confianza del 95%. Elaboración propia.*

La ausencia de valores de Lc_{50} para FF, GTM y TC hizo que solo fuera posible realizar las predicciones del comportamiento ecotoxicológico para la combinación con CHL.

La figura 59 muestra la comparativa entre los resultados experimentales obtenidos y las predicciones generadas a partir de los dos modelos empleados en *A. fischeri*:

Figura 59: Comparación entre resultados experimentales y predicciones del modelo en curvas dosis-respuesta para A. fischeri



Comparación entre los resultados experimentales y las predicciones del modelo de la curva dosis-respuesta para A. fischeri después de 30 minutos de exposición a SACTA 3 (Terpineol 125 µg/mL + Cloranfenicol 15.6 µg/mL). La línea sólida representa los resultados experimentales, mientras que las líneas discontinuas indican las predicciones del modelo. Elaboración propia.

SACTAs que han mostrado un comportamiento sinérgico en *A. fischeri*:

Como era de esperarse al tratarse de una bacteria, la combinación de CHL y TER, que previamente ha demostrado una potente acción sinérgica contra bacterias patógenas, también ha exhibido un efecto sinérgico en la inhibición de la luminiscencia de *A. fischeri*. Este efecto sugiere que los mecanismos de acción de ambos compuestos no solo son eficaces contra patógenos clínicos, sino que también impactan significativamente a bacterias ambientales.

La sinergia entre los efectos de TER y CHL sobre *A. fischeri* puede atribuirse a su acción complementaria en la disrupción de la integridad celular y en la afectación a procesos esenciales de la bacteria. Por un lado, la disrupción de la membrana celular causada por TER y su capacidad para alterar la bicapa lipídica comprometen la estabilidad estructural y la homeostasis de la célula, aumentando la permeabilidad celular. Por otro lado, la acción del CHL se ve favorecida por este efecto, que ve favorecida su penetración y su acumulación intracelular, amplificando su acción inhibidora sobre la síntesis proteica. Esta interacción sinérgica explica el mayor impacto tóxico observado en *A. fischeri* de la cepa SACTA 3 en comparación con los efectos

individuales de cada compuesto. Un fenómeno similar se ha observado en mezclas de cloro con otros compuestos, que han mostrado incrementos sinérgicos en la toxicidad hacia *A. fischeri* (Rosal et al. 2010). Sin embargo, el impacto de esta combinación no se limita únicamente a la disrupción de la membrana y la inhibición de la síntesis proteica, sino que también involucra la generación de estrés oxidativo y la alteración de los mecanismos de defensa bacterianos.

Uno de los factores clave en la sinergia observada es la inducción de especies reactivas de oxígeno, que pueden causar daño a nivel de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, acelerando la muerte celular. Este mecanismo ha sido documentado en diversos estudios, donde se ha observado que la exposición a antimicrobianos como CHL genera un aumento en la producción de estos compuestos, lo que incrementa la toxicidad en bacterias sensibles (Albesa et al. 2004). En este contexto, la acción de TER podría potenciar este efecto al comprometer las defensas antioxidantes de la célula y aumentar la susceptibilidad al daño oxidativo (Agus et al. 2022).

Adicionalmente, la combinación de CHL y TER podría interferir con los mecanismos de resistencia bacteriana, lo que contribuiría a una mayor acumulación intracelular del antibiótico y a un incremento en su toxicidad. En particular, CHL es conocido por ser expulsado activamente de la célula mediante bombas de eflujo (Hou et al. 2019), así como por ser inactivado a través de enzimas específicas, como la cloranfenicol acetiltransferasa, un mecanismo de resistencia reportado en *Aliivibrio parahaemolyticus* (Zhang et al. 2019b). Si el TER es capaz de afectar a la funcionalidad de estas bombas de eflujo o interferir con la síntesis y actividad de las enzimas inactivadoras, la bacteria quedaría más expuesta al CHL, lo que explicaría la reducción en la Lc_{50} observada.

Otro aspecto relevante de la toxicidad inducida por esta combinación es el daño potencial a las membranas de los orgánulos citoplasmáticos, lo que podría generar disrupciones en múltiples rutas celulares simultáneamente. Se ha documentado que agentes que alteran la estructura lipídica, como TER, pueden comprometer la funcionalidad de orgánulos esenciales, afectando procesos metabólicos clave (Sikkema et al. 1994). Este tipo de alteraciones estructurales han sido descritas en estudios previos con combinaciones de otros antibióticos, en los que se ha observado un colapso celular acelerado debido a la interrupción de múltiples funciones fisiológicas esenciales (Bubrick et al. 1983).

7.5.5 Ecotoxicidad de las combinaciones sinérgicas de terpineol y antibióticos sobre comunidades microbianas acuáticas

7.5.5.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua

Las principales características físico-químicas de los ecosistemas acuático de los que se obtuvieron las muestras utilizadas en este estudio se detallan en el Anexo 5.2.

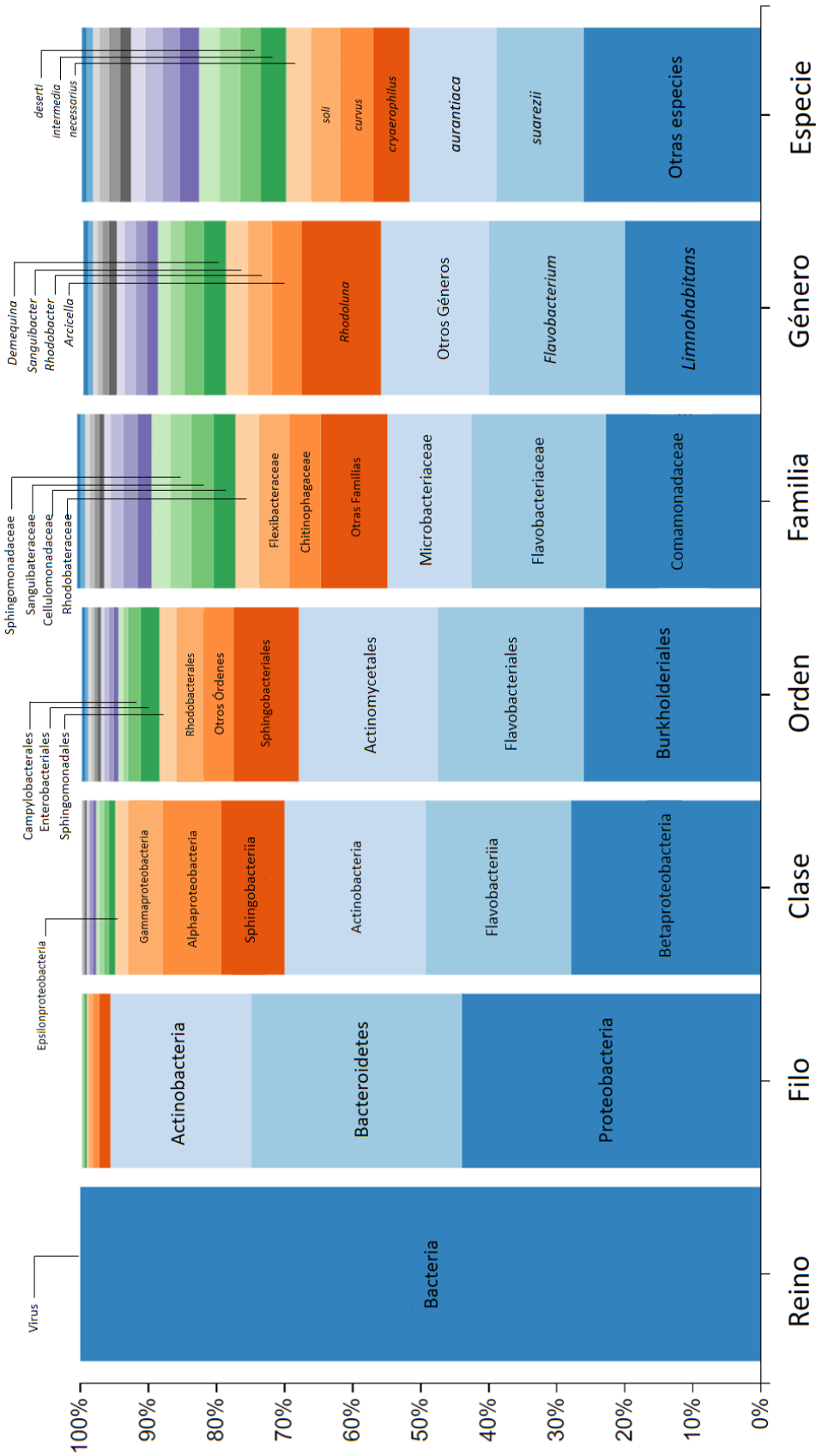
7.5.5.2 Secuenciación genética 16S de las comunidades microbianas acuáticas

La Figura 60 representa de manera detallada los taxones más prevalentes de los microorganismos identificados en el río Gállego, considerando únicamente aquellos cuya presencia supera el umbral del 2%. Para la identificación de estos microorganismos, se llevó a cabo un proceso de secuenciación que resultó en un total de 303953 lecturas.

En esta representación gráfica, los microorganismos se encuentran organizados en función de su distribución dentro de cada nivel taxonómico, desde los niveles más generales hasta los más específicos. El análisis logró una cobertura excepcional en los niveles superiores, alcanzando una clasificación superior al 95% en los niveles de filo, clase, orden y familia, mientras que en el nivel de género se obtuvo una identificación superior al 93%. Sin embargo, a medida que se profundizó en la clasificación taxonómica, la precisión disminuyó significativamente, logrando identificar solo el 24% de los microorganismos secuenciados a nivel de especie. Esta tendencia refleja una limitación común en estudios de metagenómica ambiental, derivada de la representación incompleta de ciertas secuencias en las bases de datos de referencia.

Por otro lado, la Figura 61 ofrece una representación visual detallada de los principales filos bacterianos presentes en el ecosistema fluvial estudiado. Mediante un gráfico de sectores, se ilustran sus respectivos porcentajes de abundancia relativa, lo que facilita la interpretación de la composición microbiana del río y permite identificar los grupos taxonómicos más representativos dentro de la comunidad bacteriana.

Figura 60: Taxones más prevalentes de los microorganismos del río en cada nivel taxonómico.



Abundancia relativa de los microorganismos de la muestra de agua secuenciados genéticamente según sus clasificaciones taxonómicas. Elaboración propia.

Figura 61: Principales filos bacterianos en la muestra de río

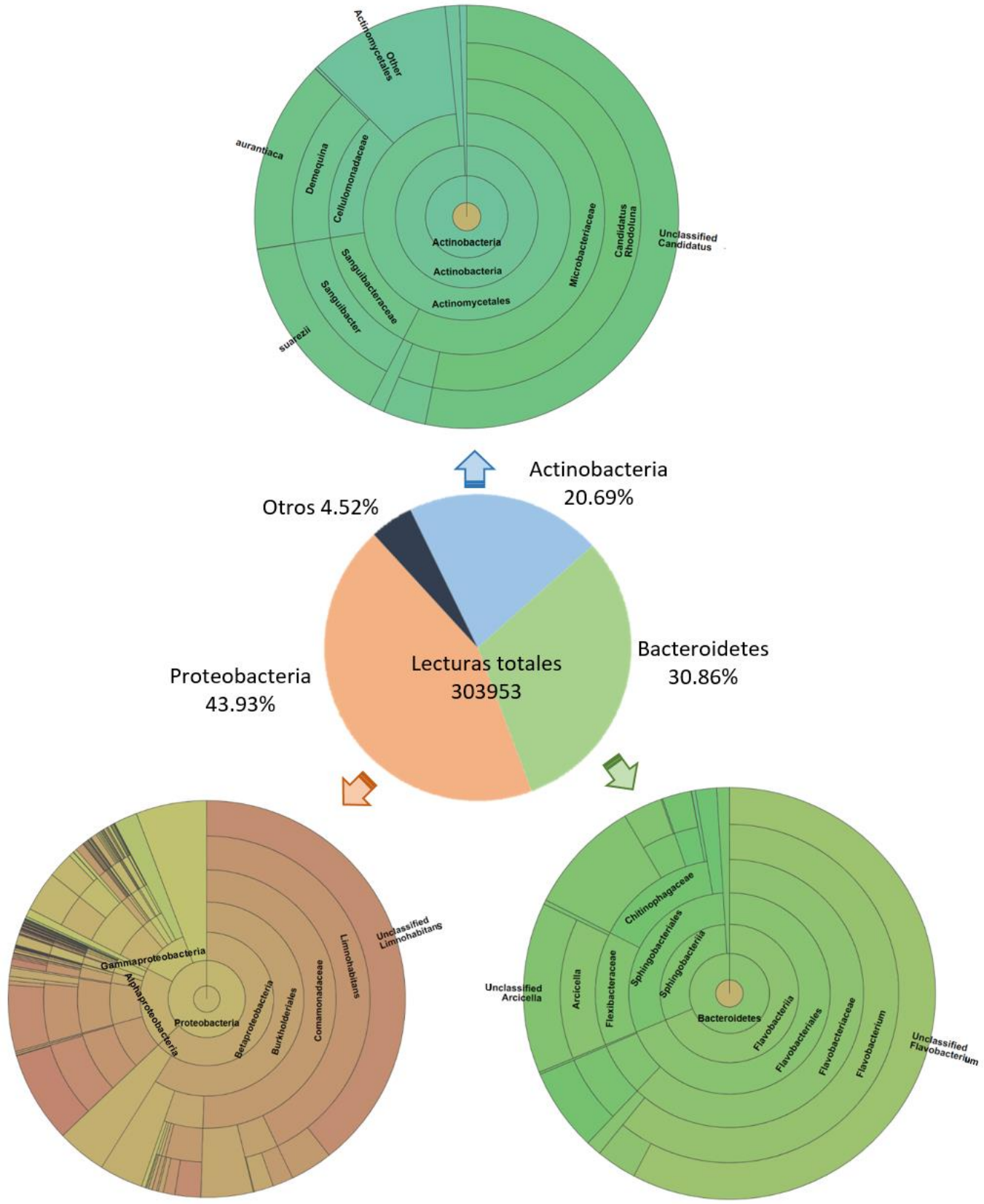


Ilustración de los filos más abundantes detectados en el río. Elaboración propia.

El análisis reveló que los tres filos predominantes fueron *Proteobacteria*, con un 43.93% de las lecturas bacterianas, seguido de *Bacteroidetes* (30.86%) y *Actinobacteria* (20.69%). Estos microorganismos son altamente representativos de las poblaciones microbianas típicamente presentes en este tipo de ecosistemas (Madigan et al., 2015), lo que indica una prevalencia de bacterias gram-negativas en el entorno. Además, un 4.52% de las lecturas no pudo ser identificado, lo que sugiere la posible presencia de secuencias aún no caracterizadas o insuficientemente representadas en las bases de datos de referencia.

El filo *Proteobacteria* es uno de los grupos más abundantes dentro de las bacterias gram-negativas, representando alrededor del 40% de las comunidades bacterianas en ecosistemas de agua dulce (Battistuzzi and Hedges 2009). Su éxito en estos ambientes se debe a su rápido crecimiento y su capacidad para responder eficazmente a los pulsos de nutrientes orgánicos, lo que les otorga una ventaja competitiva en entornos dinámicos.

Dentro de este filo, las clases *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* destacan como las más predominantes en hábitats de agua dulce, seguidas por *Gammaproteobacteria* (Pino-Otín et al. 2021), una tendencia que también se reflejó en estos resultados. En particular, los *Betaproteobacteria* presentan una notable abundancia en ecosistemas fluviales, con la mayoría de los representantes pertenecientes al orden *Burkholderiales*, un grupo ampliamente distribuido en ríos de diversas regiones del mundo (Pino-Otín et al. 2021, Beale et al. 2017, Staley et al. 2015).

Por otro lado, las bacterias del filo *Alphaproteobacteria* destacan por su capacidad para prosperar en ambientes oligotróficos, caracterizados por una baja disponibilidad de nutrientes. Esta adaptabilidad les permite colonizar ecosistemas acuáticos menos productivos y desempeñar funciones clave en el ciclo de los nutrientes (Madigan et al., 2015). Dentro de esta clase, los órdenes más representativos en nuestras muestras fueron *Rhodobacterales* y *Sphingomonadales*, ambos considerados grupos dominantes en otros ríos españoles (Aguirre et al. 2017).

En cuanto a los *Gammaproteobacteria*, su presencia en el ecosistema fluvial analizado estuvo principalmente representada por el orden *Enterobacteriales*, un grupo de bacterias conocido por su gran versatilidad metabólica. Estas bacterias poseen la capacidad de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono y nutrientes, lo que les

permite adaptarse a diversas condiciones ambientales y colonizar distintos nichos ecológicos (Zhang et al. 2020b).

El filo *Bacteroidetes* desempeña un papel crucial en el metabolismo fluvial debido principalmente a su capacidad para descomponer materia orgánica compleja. En las muestras empleadas en este estudio, los miembros más predominantes dentro de este filo pertenecen a las clases *Flavobacteria* y *Sphingobacteria,* ambas conocidas por su actividad en la degradación de polímeros de alto peso molecular, como carbohidratos complejos, proteínas y otros compuestos orgánicos. Estos microorganismos poseen un amplio repertorio de enzimas hidrolíticas que les permiten descomponer eficientemente sustancias como la celulosa, la quitina y otros biopolímeros presentes en el material orgánico suspendido y sedimentado en los cuerpos de agua (O'Sullivan et al. 2006).

Debido a su función ecológica clave, *Bacteroidetes* suele encontrarse en ambientes acuáticos ricos en materia orgánica, como ríos urbanos o cuerpos de agua afectados por descargas de efluentes domésticos e industriales. Diversos estudios han reportado su frecuente aparición en ríos urbanos, donde su abundancia está asociada a la disponibilidad de nutrientes derivados de la actividad humana (Jin et al. 2018, Narciso-da-Rocha and Manaia 2016).

Finalmente, el filo *Actinobacteria*, representado en su mayoría por miembros del orden *Actinomycetales*, desempeña un papel fundamental en los ecosistemas fluviales, contribuyendo activamente a la descomposición de materia orgánica y a la regulación de los ciclos biogeoquímicos clave, como los del carbono y el nitrógeno (Zhang et al. 2019a).

En entornos contaminados o sujetos a presión antropogénica, las *Actinomycetales* han demostrado una notable capacidad de adaptación y colonización de nichos ecológicos específicos, incluso en hábitats con altas concentraciones de metales pesados, contaminantes orgánicos y otros compuestos tóxicos (Duran et al. 2015). Su resistencia a condiciones ambientales adversas y su habilidad para degradar contaminantes las convierten en potenciales agentes de biorremediación, lo que refuerza su relevancia en la recuperación de ecosistemas acuáticos impactados.

7.5.5.3 Efecto de las combinaciones en las comunidades bacterianas acuáticas: AWCD y CLPP

La complejidad de interacciones detectada en los organismos indicadores acuáticos se vuelve aún más pronunciada cuando se estudia el impacto de las SACTAs en las comunidades microbianas presentes en ecosistemas fluviales, donde la dinámica ambiental y las interacciones entre distintos factores influyen significativamente en la composición y funcionalidad de estos microorganismos. Cualquier alteración en la composición y actividad de las comunidades microbianas puede tener repercusiones en cascada que afectan a todo el ecosistema del río. La presencia de contaminantes puede alterar la dinámica y comprometer la capacidad del ecosistema para recuperarse de perturbaciones externas. Por ello, el estudio detallado de estas comunidades resulta crucial para comprender el impacto de la actividad humana en los ecosistemas acuáticos y desarrollar estrategias para su conservación y manejo sostenible (Battin et al. 2009).

Los efectos de las cinco SACTAs sobre el crecimiento de las poblaciones microbianas fluviales, medidos a través del AWCD, se representan en los gráficos a1 de las Figuras 62 a 66. Estos gráficos proporcionan una representación detallada de la cinética de crecimiento de una misma población bacteriana bajo diferentes condiciones de exposición a combinaciones de antimicrobianos y sus componentes individuales.

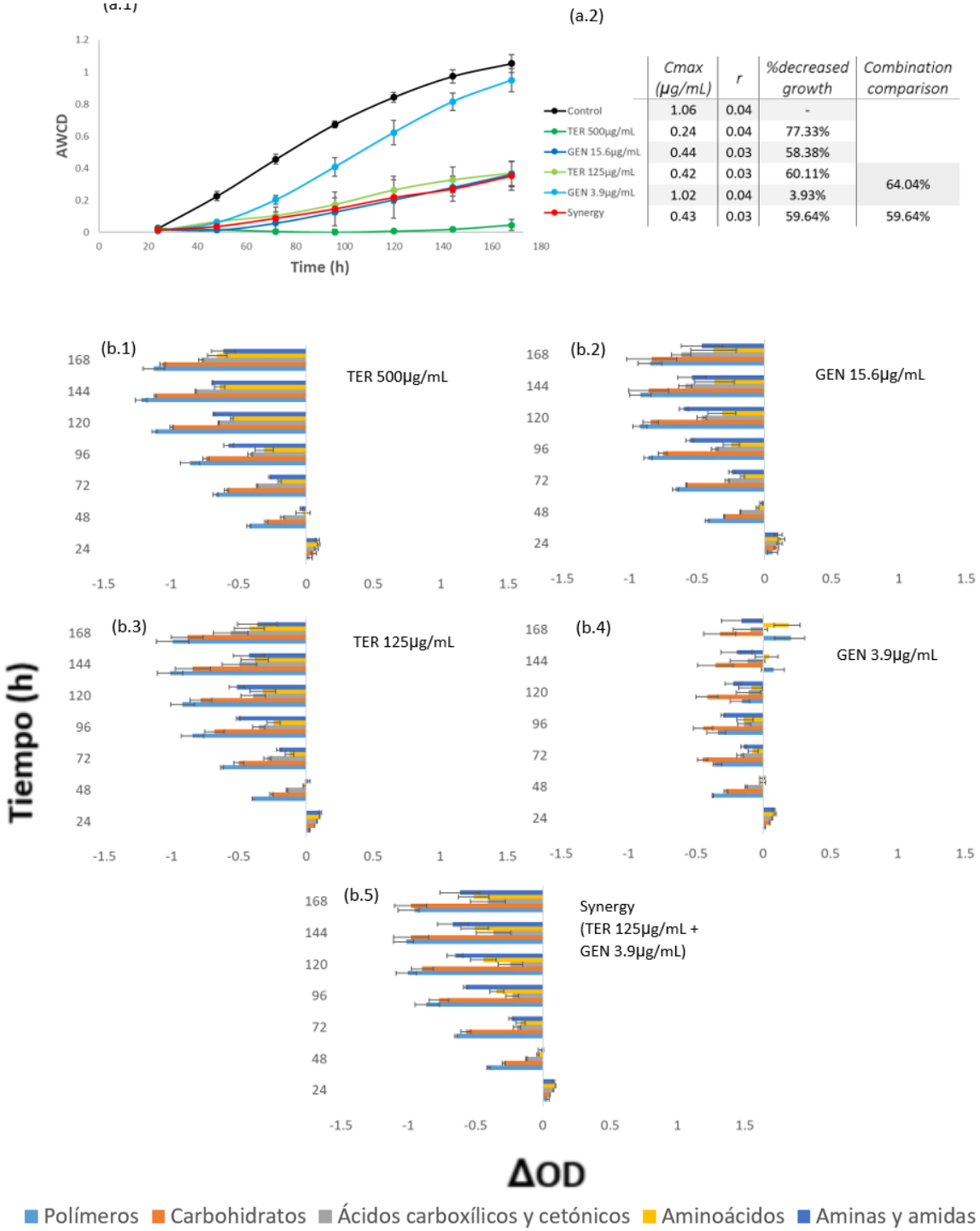
Por un lado, la curva roja muestra la cinética de crecimiento de la población bacteriana cuando es expuesta a la combinación de SACTA, permitiendo evaluar su efecto en conjunto. Para analizar el papel individual de cada componente, se incluyen las curvas correspondientes a la exposición al compuesto TER en concentración de sinergia (verde claro) y al antibiótico en concentración de sinergia (azul claro). Por otro lado, para una comparación más exhaustiva, también se representan las curvas de crecimiento cuando el TER y el antibiótico son administrados a su concentración MIC, con curvas de color verde oscuro y azul oscuro, respectivamente. Finalmente, como referencia, se representa una curva negra que refleja el comportamiento del control negativo, es decir, la cinética de crecimiento de la población bacteriana en ausencia de cualquier antimicrobiano.

Con el objetivo de caracterizar con mayor precisión la cinética de crecimiento de las curvas obtenidas, se calcularon los valores de *Cmax* y *r* para cada una de ellas, cuyos resultados se presentan en los gráficos a2 de las Figuras 62 a 66. Además, se determinó

el porcentaje de reducción de *Cmax* para cada curva en relación con el control negativo, lo que facilita la medición del efecto inhibitorio de cada tratamiento sobre el crecimiento bacteriano. Para una interpretación más detallada, la última columna de los gráficos compara la reducción porcentual de *Cmax* entre la combinación de SACTA y sus dos componentes individuales (antibiótico y TER). A partir de estos valores, se establecieron tres categorías de interacción entre los antimicrobianos. Se consideró sinergia cuando la reducción de Cmax observada en la combinación de SACTA superaba la suma esperada de las reducciones individuales de sus componentes, lo que sugiere un efecto combinado superior al esperado. Por el contrario, se clasificó como antagonismo cuando la reducción de *Cmax* en SACTA fue menor que la suma esperada de los efectos individuales, lo que indica una posible interferencia entre los compuestos que disminuye su eficacia. Finalmente, se definió como aditividad cuando la reducción de *Cmax* en la combinación fue aproximadamente igual a la suma de las reducciones individuales, lo que sugiere un efecto acumulativo sin interacción adicional entre los compuestos.

Finalmente, los resultados del impacto de todas las anteriores condiciones experimentales causadas en el metabolismo de cinco grupos de metabolitos (Polímeros, Carbohidratos, Ácidos Carboxílicos y Cetónicos, Aminoácidos y Aminas/Amidas) se representan en las Figuras 62b-66b. Estas figuras ofrecen una visión detallada de las modificaciones en el perfil metabólico de la población bacteriana, permitiendo identificar posibles alteraciones en la capacidad de utilización de distintos sustratos.

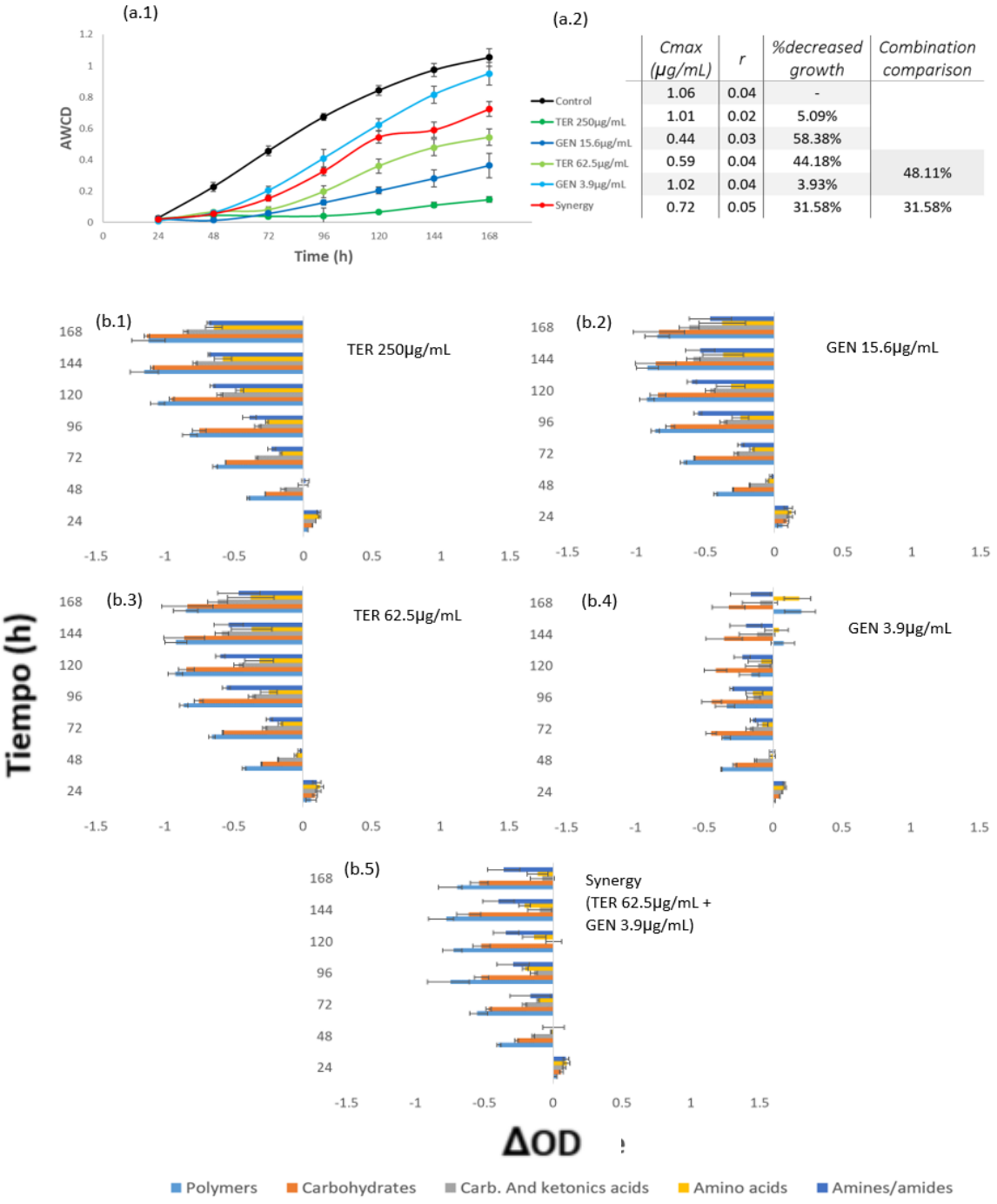
Figura 62: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA1



	Cmax (µg/mL)	r	%decreased growth	Combination comparison
Control	1.06	0.04	-	
TER 500µg/mL	0.24	0.04	77.33%	
GEN 15.6µg/mL	0.44	0.03	58.38%	
TER 125µg/mL	0.42	0.03	60.11%	64.04%
GEN 3.9µg/mL	1.02	0.04	3.93%	
Synergy	0.43	0.03	59.64%	59.64%

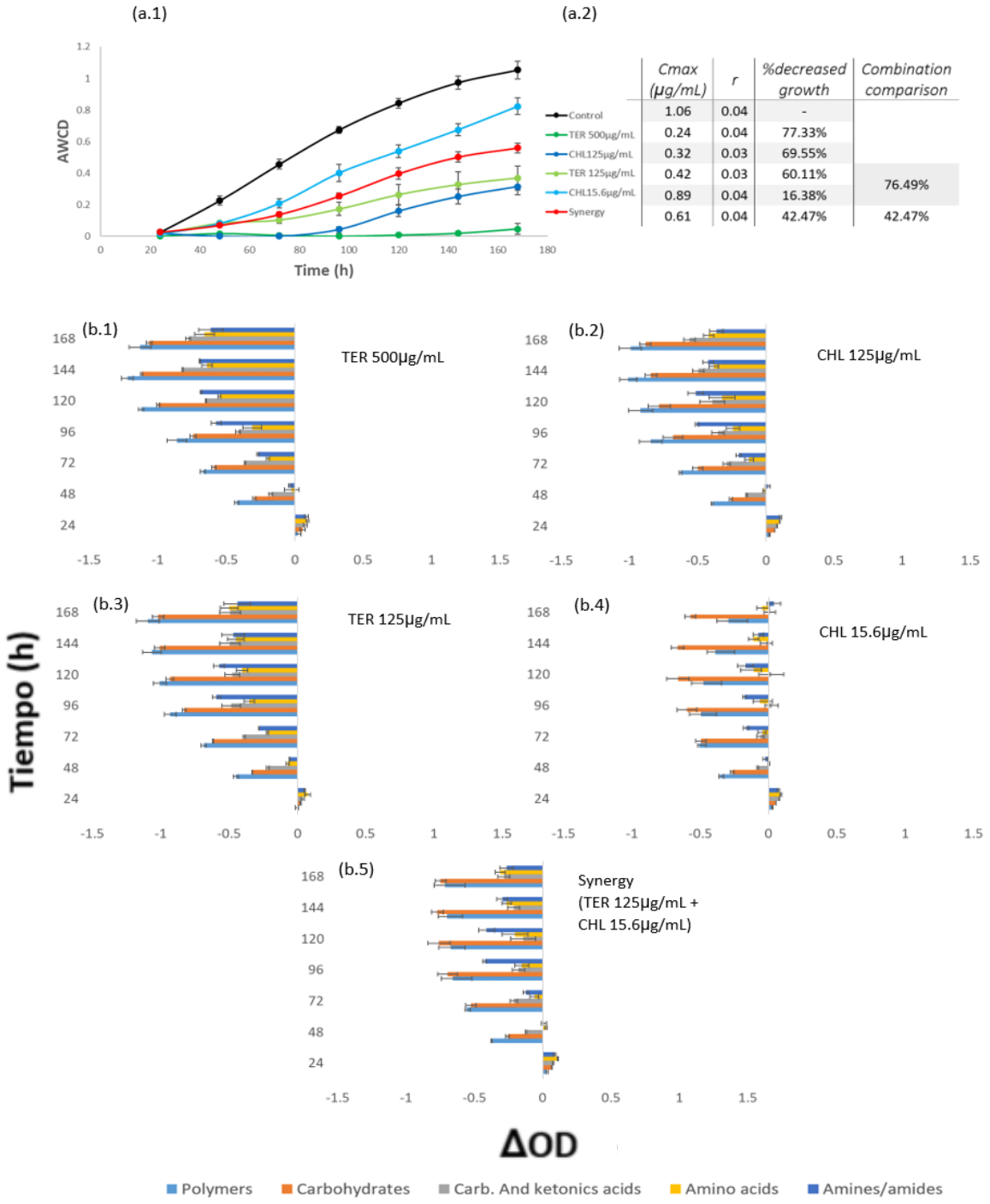
Valores de AWCD (a.1), Cmax, r, % de reducción del crecimiento (a.2) y diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono (b.1–b.5) en Biolog EcoPlates tras 168 h de incubación de microorganismos fluviales expuestos a TER y GTN a concentraciones MIC y de sinergia de SACTA 1. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. Los valores de Cmax y r se determinaron utilizando el complemento Solver de Excel (Microsoft 365). La reducción del crecimiento se calculó comparando el Cmax del compuesto con el del control. Elaboración propia.

Figura 63: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA2



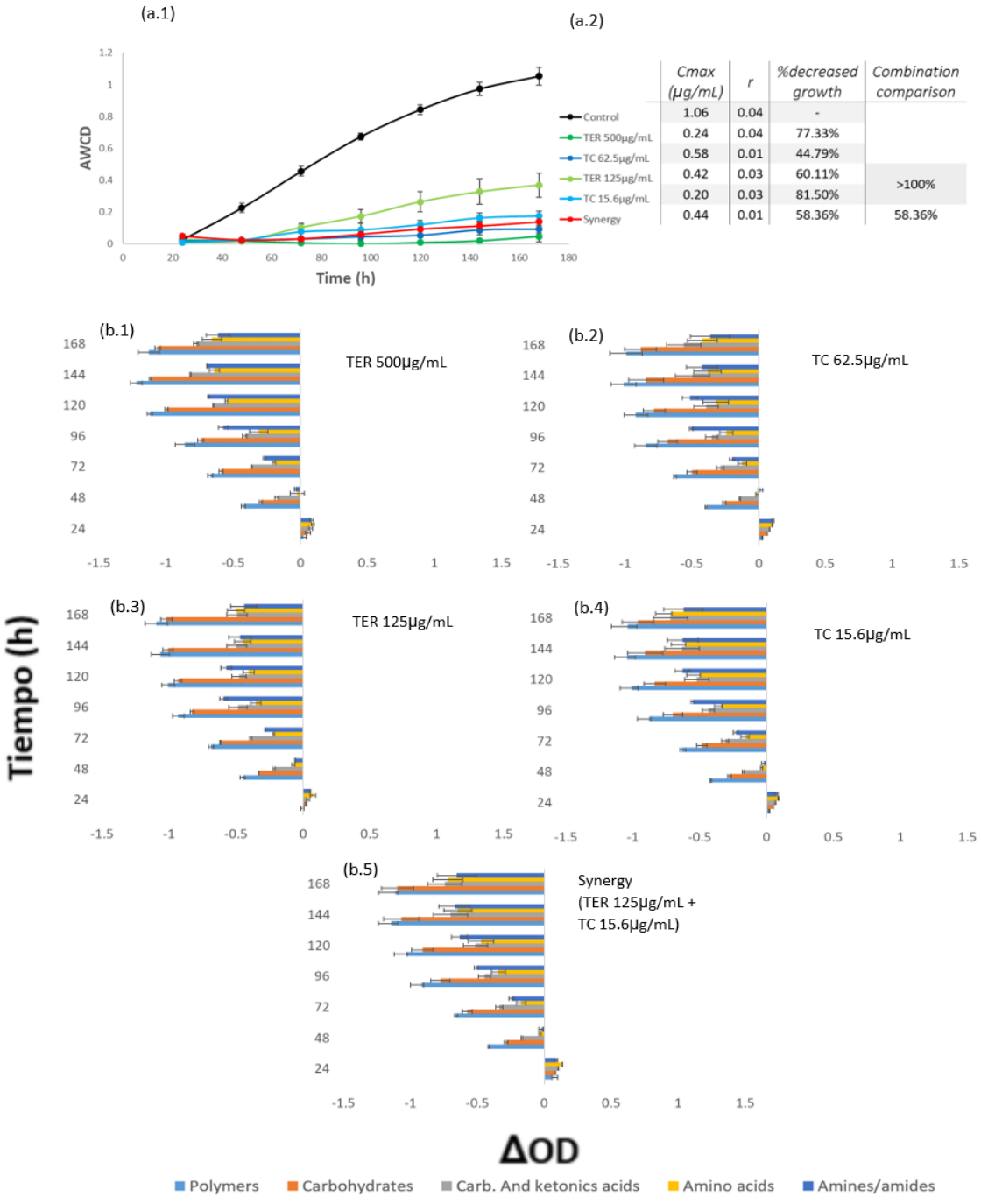
Valores de AWCD (a.1), Cmax, r, % de reducción del crecimiento (a.2) y diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono (b.1–b.5) en Biolog EcoPlates tras 168 h de incubación de microorganismos fluviales expuestos a TER y GTN a concentraciones MIC y de sinergia de SACTA 2. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. Los valores de Cmax y r se determinaron utilizando el complemento Solver de Excel (Microsoft 365). La reducción del crecimiento se calculó comparando el Cmax del compuesto con el del control. Elaboración propia

Figura 64: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA3



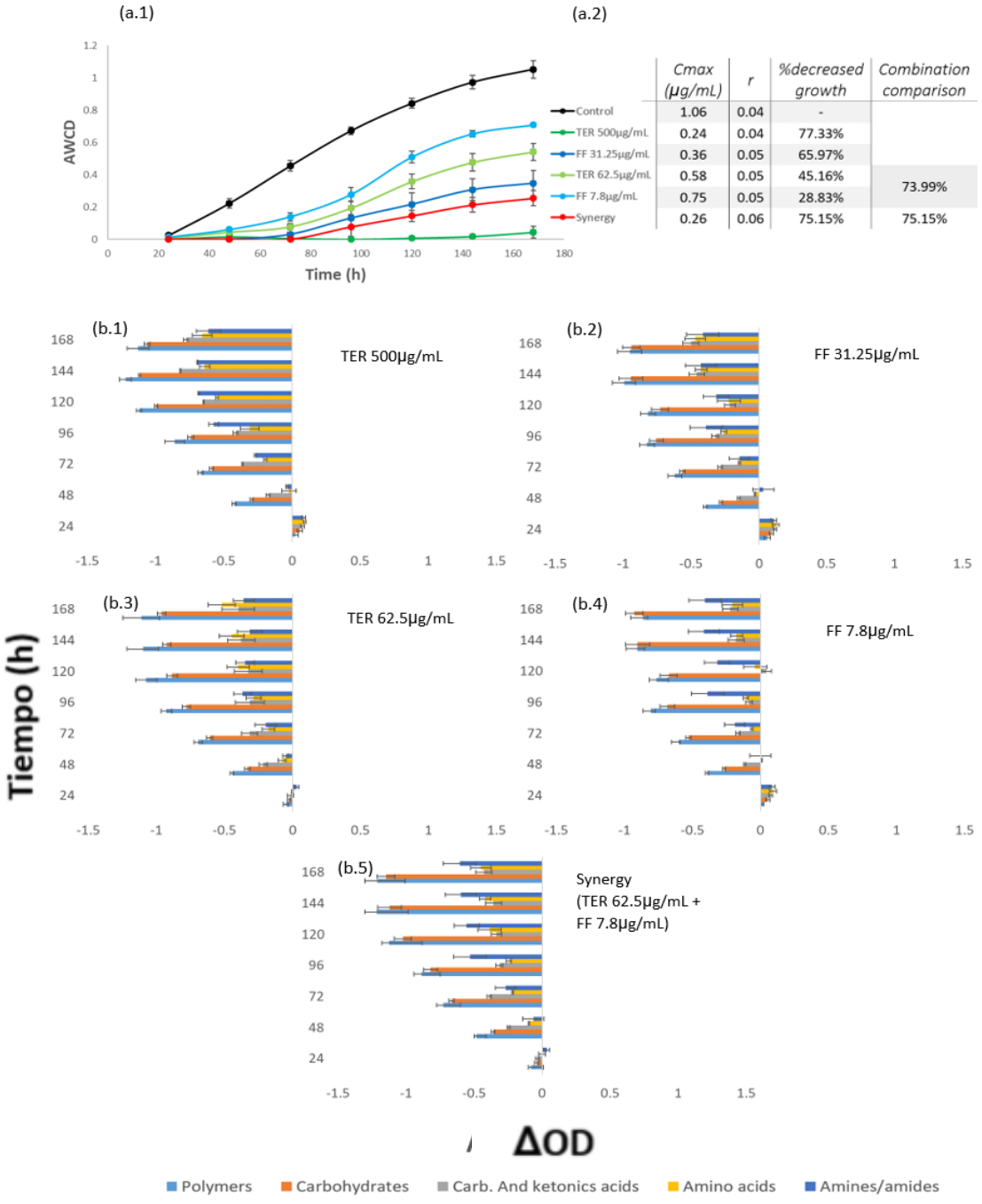
Valores de AWCD (a.1), Cmax, r, % de reducción del crecimiento (a.2) y diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono (b.1–b.5) en Biolog EcoPlates tras 168 h de incubación de microorganismos fluviales expuestos a TER y CHL a concentraciones MIC y de sinergia de SACTA 3. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. Los valores de Cmax y r se determinaron utilizando el complemento Solver de Excel (Microsoft 365). La reducción del crecimiento se calculó comparando el Cmax del compuesto con el del control. Elaboración propia

Figura 65: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA4



Valores de AWCD (a.1), Cmax, r, % de reducción del crecimiento (a.2) y diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono (b.1–b.5) en Biolog EcoPlates tras 168 h de incubación de microorganismos fluviales expuestos a TER y TC a concentraciones MIC y de sinergia de SACTA 4. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. Los valores de Cmax y r se determinaron utilizando el complemento Solver de Excel (Microsoft 365). La reducción del crecimiento se calculó comparando el Cmax del compuesto con el del control. Elaboración propia

Figura 66: Crecimiento de bacterias de agua tras la exposición a los componentes de SACTA5



	Cmax (µg/mL)	r	%decreased growth	Combination comparison
Control	1.06	0.04	-	
TER 500µg/mL	0.24	0.04	77.33%	
FF 31.25µg/mL	0.36	0.05	65.97%	
TER 62.5µg/mL	0.58	0.05	45.16%	73.99%
FF 7.8µg/mL	0.75	0.05	28.83%	
Synergy	0.26	0.06	75.15%	75.15%

Valores de AWCD (a.1), Cmax, r, % de reducción del crecimiento (a.2) y diferenciación del efecto metabólico según las fuentes de carbono (b.1–b.5) en Biolog EcoPlates tras 168 h de incubación de microorganismos fluviales expuestos a TER y FF a concentraciones MIC y de sinergia de SACTA 5. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. Los valores de Cmax y r se determinaron utilizando el complemento Solver de Excel (Microsoft 365). La reducción del crecimiento se calculó comparando el Cmax del compuesto con el del control. Elaboración propia

Los resultados obtenidos indican que los cinco SACTAs ejercen un efecto similar o inferior sobre el crecimiento de las comunidades microbianas en comparación con el antibiótico que la constituye a su concentración de MIC (ver Tabla 29). En contraste, TER a su concentración MIC se presenta como el compuesto más tóxico en todas las condiciones evaluadas. La toxicidad observada en las comunidades microbianas fluviales es distinta de la reportada en organismos individuales, lo que sugiere diferencias clave en la forma en que los antimicrobianos afectan distintos niveles biológicos.

El impacto de los SACTA en las comunidades bacterianas se evaluó de manera cuantitativa mediante la reducción de los valores de *Cmax* en comparación con el control negativo, proporcionando una medida precisa del efecto inhibitorio de estos compuestos sobre el crecimiento microbiano (ver Tabla a2 en las Figuras 62 a 66). Este análisis permitió establecer una clasificación de toxicidad de mayor a menor, determinada en función del grado de reducción en *Cmax*, quedando el orden de toxicidad como sigue: SACTA 5 > SACTA 1 > SACTA 4 > SACTA 3 > SACTA 2.

Los resultados revelan que, en el contexto de comunidades microbianas fluviales, SACTA 5 con FF (y no con CHL) es el más tóxico. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que contrasta con estudios previos realizados en organismos individuales en los que la combinación con CHL era la más toxica de todas.

Al evaluar la toxicidad de los SACTA en comparación con la de sus componentes individuales (antibióticos o TER a concentración sinérgica), se identificó que, en la mayoría de los casos, los efectos fueron aditivos, mientras que el comportamiento predominante fue antagónico, sin evidencia de sinergia. Esto indica que la combinación de antimicrobianos no potencia significativamente su efecto tóxico en comunidades microbianas fluviales, sino que, en algunos casos, su interacción reduce la toxicidad esperada basada en los efectos individuales de los compuestos.

Este patrón es especialmente relevante, ya que contrasta con los resultados obtenidos en organismos modelo como *D. magna* y *A. fischeri*, donde se han observado interacciones distintas entre los antimicrobianos evaluados como se ha expuesto anteriormente.

Hasta la fecha, este estudio representa el primer análisis detallado sobre la toxicidad combinada de una mezcla antimicrobiana compuesta por productos naturales y antibióticos en poblaciones bacterianas de ecosistemas fluviales.

En contraste, estudios previos han analizado los efectos de combinaciones comerciales de antibióticos en comunidades microbianas del medio ambiente, revelando diferencias significativas en la toxicidad observada cuando se comparan organismos individuales con comunidades microbianas complejas (Hagenbuch and Pinckney 2012). Estos hallazgos sugieren que la respuesta de los microorganismos a la exposición a antimicrobianos varía sustancialmente según el nivel de organización biológica, lo que subraya la importancia de evaluar los efectos de estos compuestos en sistemas ecológicos más representativos y no solo en modelos de toxicidad basados en organismos individuales.

La literatura científica ha documentado ampliamente que muchas combinaciones comerciales de antibióticos tienden a potenciar su toxicidad mediante efectos sinérgicos, lo que se ha observado en distintos estudios sobre microorganismos acuáticos (González-Pleiter et al. 2013, Menz et al. 2017, Christensen, Ingerslev and Baun 2006, Proia et al. 2013), lo que contrasta con los resultados obtenidos en esta investigación al combinar distintos antibióticos con TER.

SACTAs que han mostrado un comportamiento antagónico en las comunidades microbianas acuáticas

En las SACTAs 2, 3 y 4, que contienen GTM, CHL y TC, respectivamente (Figuras 62a1–64a1), se observa una reducción significativa en los valores de *Cmax*, con disminuciones que oscilan entre un 16.52 % y un 41.56 % en comparación con el control. Este descenso, aunque notable, es inferior a lo esperado si se considera la suma de los efectos individuales de los antibióticos o TER por separado (Figuras 62a2–64a2b). Este fenómeno sugiere que la toxicidad de la combinación de estos compuestos presenta una interacción que mitiga su efecto conjunto.

La presencia de un efecto antagonista en la toxicidad de la mezcla es un hallazgo relevante, ya que implica que la combinación de estos agentes no potencia la toxicidad de forma proporcional, sino que, por el contrario, ciertos mecanismos biológicos o químicos pueden estar reduciendo su impacto total. Si bien la toxicidad antagonista entre

antibióticos comerciales es un fenómeno poco común, algunos estudios han identificado este tipo de interacciones en procesos de generación de resistencia bacteriana (Ding and He 2010)

Además, el TER exhibe una toxicidad significativamente mayor que la combinación de antibióticos, tanto a su concentración MIC como a su concentración en la propia sinergia. En contraste, los antibióticos muestran toxicidad únicamente cuando se encuentran a su MIC. Esto sugiere que el TER tiene un impacto más amplio sobre las comunidades microbianas expuestas. Esta diferencia podría atribuirse a los mecanismos de acción distintivos de TER, que afectan una gama más amplia de procesos celulares en comparación con los antibióticos, cuyo efecto es más dependiente de la dosis y de la sensibilidad específica de los microorganismos presentes (Yang et al. 2023b, Bernier and Surette 2013).

Estudios previos han demostrado que tanto el CHL como la TC, cuando se administran de manera individual, generan una toxicidad elevada en las comunidades microbianas fluviales, con impactos sustanciales en el crecimiento y en los perfiles metabólicos de estas poblaciones (Pino-Otín et al. 2023a). Estos efectos adversos pueden alterar la estructura y funcionalidad de los ecosistemas acuáticos, reduciendo la diversidad microbiana y afectando procesos esenciales como la degradación de materia orgánica y el ciclo de nutrientes.

Particularmente preocupante es el efecto de TC en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, donde su presencia puede comprometer gravemente la integridad del lodo activado. Se ha documentado que la TC es capaz de inducir la desintegración de flóculos y la ruptura celular en los microorganismos responsables del tratamiento, lo que conlleva una disminución en la eficiencia del sistema y potenciales fallos en la eliminación de contaminantes (Liao et al. 2021). Este fenómeno no solo representa un riesgo para la calidad del agua tratada, sino que también puede favorecer la dispersión de bacterias resistentes y la acumulación de antibióticos en el ambiente, empeorando los problemas asociados a la resistencia antimicrobiana (Korzeniewska and Harnisz 2018).

Curiosamente, los SACTAs evaluados presentan una toxicidad similar o incluso menor que la observada para los antibióticos a su MIC, particularmente las combinaciones 2 (GTM) y 3 (CHL). Este hallazgo sugiere que, desde una perspectiva

ambiental, la formulación de combinaciones específicas de estos antibióticos y el TER podría representar una estrategia viable para reducir el impacto ecológico sin comprometer su efectividad.

En cuanto a los perfiles metabólicos (Figuras 62b–64b), se observa que la capacidad de metabolización de polímeros y carbohidratos es la más afectada, registrándose reducciones significativas en todos los casos evaluados. Las mayores disminuciones en la actividad metabólica se registran en presencia de GTM y TER a sus concentraciones MIC individuales, lo que indica que estos compuestos, cuando actúan en solitario, generan un mayor impacto en las comunidades microbianas. Sin embargo, al combinarse con otros antibióticos, los efectos sinérgicos tienden a reducirse, reflejando el efecto antagonista observado también en el crecimiento bacteriano.

Las comunidades bacterianas analizadas exhiben una notable diversidad taxonómica y funcional, con especies que presentan sensibilidades variables a los antibióticos y al TER, lo que complica la predicción de sus efectos de manera precisa. Mientras que en estudios de monocultivo la respuesta a los antibióticos es generalmente homogénea y más fácilmente modelable, en comunidades microbianas complejas los efectos pueden ser modulados por múltiples factores, incluyendo interacciones interespecíficas, competencia por recursos, producción de metabolitos secundarios y variaciones en la expresión de genes relacionados con la resistencia (Kulik et al. 2023). La comunidad microbiana evaluada incluye tanto bacterias gram-negativas, como *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, como gram-positivas, como las *Actinobacterias*. Esta heterogeneidad estructural implica diferencias significativas en la permeabilidad celular a los compuestos químicos y en la capacidad de los microorganismos para metabolizar, modificar o expulsar los antibióticos y antifúngicos. Esta diversidad probablemente atenúe los efectos sinérgicos observados en SACTA 3 en *A. fischeri*, favoreciendo un equilibrio dinámico dentro de la comunidad microbiana. Es posible que ciertas cepas bacterianas más resistentes compensen la inhibición de aquellas más sensibles, permitiendo la persistencia del ecosistema microbiano a pesar de la exposición a las combinaciones.

Por último, cabe destacar que las combinaciones de TER con antibióticos generan una reducción significativa en el crecimiento bacteriano, pero no lo eliminan por completo en la mayoría de los casos, con la posible excepción de SACTA 4, donde el efecto inhibitorio es más pronunciado. Este hallazgo sugiere la existencia de mecanismos

de supervivencia diferencial dentro de las comunidades microbianas expuestas, en los cuales las bacterias menos sensibles logran persistir y eventualmente reemplazan a aquellas más vulnerables a la combinación de compuestos. Un ejemplo de cómo los antibióticos pueden alterar la dinámica de las comunidades microbianas es el efecto del FF en ecosistemas acuáticos, donde se ha observado que su presencia modifica la estructura y composición de las poblaciones bacterianas (Zhang et al. 2022b). Además, las bacterias ambientales presentan un alto potencial para desarrollar resistencia a los antibióticos evaluados (Ortega et al. 2006, Roberts and Schwarz 2016, Noor Uddin et al. 2015). Este proceso puede ocurrir a través de diversos mecanismos evolutivos y adaptativos, incluyendo la selección de mutaciones en genes relacionados con la resistencia, la activación de sistemas de eflujo que expulsan los antibióticos fuera de la célula, y la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes, un fenómeno ampliamente documentado en entornos contaminados con antibióticos (Andersson and Hughes 2012, Stanton et al. 2022).

SACTAs que han mostrado un comportamiento aditivo en las comunidades microbianas acuáticas

En SACTA 1 (TER 125 µg/mL + GTM) y SACTA 5 (TER 62.5 µg/mL + FF), el efecto tóxico sobre el crecimiento bacteriano muestra un comportamiento aditivo cuando se compara con los impactos individuales de TER y antibióticos (Figuras 65a1 y 66a1). En el caso de SACTA 1, la reducción observada en el crecimiento (59.64%) se aproxima estrechamente a la suma de las reducciones individuales de TER y antibióticos (64.04%). De manera similar, SACTA 5 presenta una disminución del 75.15%, en estrecha concordancia con la suma de los efectos individuales (73.99%) (Figuras 62a2 y 65a2).

Estos resultados sugieren que estas combinaciones de antibióticos y TER afectan el crecimiento de las bacterias fluviales de manera independiente, sin potenciarse mutuamente, a diferencia de lo observado en los estudios anteriores con bacterias patógenas (Figura 45). La naturaleza aditiva de estos efectos implica que cada compuesto ejerce su toxicidad a través de mecanismos de acción distintos y no necesariamente complementarios dentro de la comunidad microbiana analizada. Hallazgos similares han sido reportados en estudios de comunidades bacterianas en ecosistemas acuáticos de agua dulce (ambientes lénticos), donde el incremento en la toxicidad de mezclas de antibiótico se ha atribuido mayormente a efectos aditivos, en lugar de sinérgicos (Brosche and Backhaus 2010).

En este contexto, las combinaciones de SACTA exhiben un nivel de toxicidad comparable al de los antibióticos a su concentración MIC. Este hallazgo es relevante, ya que sugiere que, desde una perspectiva ambiental, la administración conjunta de TER y antibióticos no potencia los efectos adversos sobre las comunidades microbianas de manera significativa.

En cuanto a la influencia en el metabolismo de sustratos, se observa un patrón similar a la disminución en la capacidad de crecimiento, lo que indica que los efectos tóxicos de las combinaciones de antibióticos y el TER afectan no solo la viabilidad de las bacterias, sino también su funcionalidad metabólica. En SACTA 1 y SACTA 5, la reducción en la actividad metabólica se manifiesta de manera aditiva con respecto a los efectos individuales de TER y de GEN o FF a sus respectivas concentraciones en sinergia. Este impacto es evidente a partir de las 48 horas de exposición y se intensifica con el tiempo, lo que sugiere que la inhibición del metabolismo no es inmediata, sino que se desarrolla progresivamente a medida que las bacterias experimentan un estrés prolongado debido a la presencia de estos compuestos. Esta disminución en la capacidad metabólica afecta principalmente la degradación de polímeros y carbohidratos, lo que podría tener implicaciones ecológicas significativas en los ecosistemas acuáticos y sedimentarios donde se desarrollan estos microorganismos.

De manera destacada, GTM a concentración de sinergia (3.9 µg/mL) muestra una leve respuesta hormética, caracterizada por un estímulo en el metabolismo bacteriano tras 144 horas de exposición. En entornos acuáticos, la exposición a concentraciones subletales de antimicrobianos puede desencadenar respuestas fisiológicas y metabólicas que no solo favorecen un crecimiento acelerado, sino que también pueden potenciar la resistencia bacteriana. Esto puede ocurrir a través de la activación de sistemas de reparación del ADN, la regulación positiva de bombas de eflujo que expulsan los compuestos tóxicos de la célula y la selección de variantes genéticas más tolerantes al antibiótico (Iavicoli et al. 2021). Con el tiempo, estas adaptaciones pueden generar comunidades microbianas más resistentes y menos sensibles a los efectos de los antibióticos, lo que tiene importantes implicaciones para la evolución de la resistencia antimicrobiana en ecosistemas naturales.

Sin embargo, este efecto desaparece cuando las concentraciones de antibióticos alcanzan niveles MIC o superiores. En estas condiciones, TER, GTM y FF impactan significativamente el perfil metabólico de los microorganismos fluviales, induciendo

efectos drásticos en la estructura y composición de la comunidad microbiana. Estos resultados están en consonancia con estudios previos que han demostrado una reducción significativa en la diversidad y la abundancia de microorganismos expuestos a antibióticos a concentraciones elevadas, en particular cuando se trata de FF y GTM en niveles MIC o superiores (Pino-Otín et al. 2023a, Pino-Otín et al. 2024, Zhang et al. 2022b).

Un ejemplo particularmente relevante de estos efectos se observa en el impacto de altas concentraciones de FF sobre las bacterias desnitrificantes en ecosistemas acuáticos. Se ha documentado que la exposición a este antibiótico provoca una drástica reducción en la riqueza y diversidad de estos microorganismos, con consecuencias directas en el ciclo del nitrógeno (Zhang et al. 2023).

Estos hallazgos refuerzan la necesidad de evaluar con mayor profundidad los efectos de la contaminación por antibióticos en ambientes acuáticos, no solo en términos de toxicidad aguda, sino también considerando las respuestas adaptativas a largo plazo. La exposición continua a concentraciones subletales podría estar impulsando la evolución de comunidades bacterianas más resistentes.

Otro hallazgo de particular relevancia es la capacidad de ciertas cepas del género *Acinetobacter* (orden *Pseudomonadales*), que representan el 8.60% de las *Gammaproteobacteria* identificadas, para proliferar en entornos con altas concentraciones de FF (Zhang et al. 2022b). Este fenómeno sugiere que estas bacterias poseen mecanismos de tolerancia o resistencia que les permiten sobrevivir e incluso prosperar en condiciones que resultarían letales para otras especies microbianas. Los análisis realizados indican que las muestras utilizadas podrían albergar poblaciones bacterianas con una elevada tolerancia a este antibiótico, lo que explicaría la ausencia de efectos sinérgicos en las combinaciones evaluadas y la manifestación de una toxicidad meramente aditiva.

Además, la elevada diversidad bacteriana presente en los ecosistemas estudiados, combinada con la acción inespecífica del TER, podría limitar la posibilidad de sinergia con los antibióticos evaluados. Este fenómeno sugiere que la TER, al no actuar sobre un blanco molecular específico en las bacterias, no logra amplificar los efectos de los antibióticos de manera significativa. Mientras que los antibióticos suelen inhibir procesos esenciales como la síntesis de proteínas (por ejemplo, tetraciclinas y

cloranfenicol), la replicación del ADN (fluoroquinolonas) o la formación de la pared celular (betalactámicos), el TER no interfiere directamente con estos procesos, sino que ejerce un daño más generalizado a nivel de membrana y metabolismo celular. Como resultado, la combinación de TER con antibióticos puede no generar un efecto sinérgico en todas las especies bacterianas, sino más bien una toxicidad aditiva o incluso antagonista en ciertos casos.

Esto sumado a la heterogeneidad taxonómica de las comunidades bacterianas, implica que distintos grupos microbianos pueden responder de manera diferencial a la exposición combinada a TER y los antibióticos. Algunas especies pueden ser más susceptibles a la alteración de la membrana inducida por TER, mientras que otras pueden poseer mecanismos de reparación o adaptación que les permitan resistir el estrés oxidativo. De manera similar, ciertas bacterias podrían ser altamente sensibles a los antibióticos utilizados, mientras que otras podrían presentar resistencia intrínseca o adquirida, minimizando el impacto de la combinación.

En conjunto, estos resultados destacan la complejidad de las interacciones entre antibióticos y productos naturales como el TER en comunidades microbianas naturales, evidenciando que la diversidad estructural, funcional y metabólica de las especies presentes juega un papel determinante en la modulación de la toxicidad observada.

Desde una perspectiva ecotoxicológica, estos hallazgos sugieren que la exposición combinada a antibióticos y el TER, no siempre resulta en efectos sinérgicos predecibles, sino que puede manifestarse como toxicidad aditiva o incluso antagonista en función de la composición de la comunidad microbiana y de los mecanismos de acción de los compuestos involucrados.

En términos de evolución de la resistencia bacteriana, la coexistencia de múltiples antimicrobianos en los ecosistemas acuáticos puede actuar como una presión selectiva que favorezca la proliferación de cepas con mecanismos de resistencia cruzada o multirresistencia. La exposición prolongada a concentraciones subletales de antibióticos puede inducir la transferencia horizontal de genes, facilitando la diseminación de determinantes genéticos de resistencia entre microorganismos ambientales y aumentando el riesgo de que estos genes se integren en patógenos clínicamente relevantes. Esto podría tener implicaciones no solo para la estabilidad de las

comunidades bacterianas en los ecosistemas acuáticos, sino también para la salud pública, al contribuir a la propagación de bacterias resistentes a múltiples fármacos.

Asimismo, la alteración de la biodiversidad microbiana y la modificación de los perfiles metabólicos pueden repercutir en procesos ecológicos esenciales, como la degradación de materia orgánica, el reciclaje de nutrientes y la regulación de los ciclos biogeoquímicos. La inhibición del metabolismo bacteriano debido a la exposición a estos contaminantes podría comprometer la eficiencia de la autodepuración de los ecosistemas acuáticos y afectar la resiliencia de las comunidades microbianas ante otros factores de estrés ambiental, como el cambio climático o la eutrofización.

Por tanto, estos resultados subrayan la necesidad de una evaluación integral del impacto de los antimicrobianos en los ecosistemas naturales, considerando no solo sus efectos tóxicos directos, sino también su papel en la evolución de la resistencia y en la alteración de los procesos ecológicos clave. Estudios a largo plazo y modelos experimentales más representativos de los ecosistemas naturales serán fundamentales para comprender con mayor precisión las consecuencias de la contaminación por antibióticos y antifúngicos, y para el desarrollo de estrategias de mitigación que minimicen sus efectos adversos sobre la biodiversidad y la funcionalidad de los ecosistemas acuáticos.

7.5.6 Comparación toxicidades SACTAs y antibióticos

Los resultados de este estudio indican que las mezclas de TER con antibióticos podrían presentar una toxicidad igual o incluso inferior a la de los antibióticos utilizados de manera individual a su MIC. Esto convierte a dichas combinaciones en alternativas terapéuticas prometedoras, ya que permiten reducir el uso de antibióticos sin comprometer su eficacia.

No obstante, en organismos modelo como *D. magna* y *A. fischeri*, este beneficio no se observa con la misma claridad. En términos generales, las SACTAs mostraron valores de LC_{50} (µg/mL) más bajos en comparación con los antibióticos solos. Sin embargo, al confrontar los valores de LC_{50} de las SACTAs con las concentraciones MIC de los antibióticos, las diferencias resultan matizadas: para FF los valores se sitúan en rangos similares, para GTM se observó menor toxicidad y únicamente en el caso de las mezclas con CHL y TC se detectó un aumento en la toxicidad.

Además de las interacciones antagónicas detectadas en estos organismos, también se evidenciaron interacciones aditivas e incluso sinérgicas que podrían incrementar la toxicidad. En contraste, al analizar comunidades microbianas fluviales complejas y diversas, las SACTAs se comportaron de forma mucho menos nociva. Los ensayos de toxicidad basados en crecimiento y perfiles metabólicos de comunidades microbianas de río demostraron que las combinaciones únicamente generaron interacciones aditivas o antagónicas, sin efectos sinérgicos, y su toxicidad fue comparable o incluso menor que la de los antibióticos a su MIC.

En cuanto a los componentes de las SACTAs, el TER presentó mayor toxicidad que los antibióticos, tanto en organismos individuales como en comunidades microbianas acuáticas. Sin embargo, las concentraciones ambientales registradas en efluentes de aguas residuales se encuentran entre $2.5x10^{-2}$ a $7.605x10^{-3}$ µg/L; (Simonich et al., 2002) por lo que son muy inferiores a su LC_{50}, lo que sugiere que la toxicidad aguda es improbable. Adicionalmente, el uso de SACTAs reduce la dosis de TER a un 12.5–25% de su MIC, y se considera que este compuesto presenta menor persistencia ambiental que los antibióticos, diseñados para ser químicamente estables. Por ejemplo, se ha documentado que TC puede mantenerse en agua de río durante más de cuatro días (Liu et al., 2019), mientras que FF y CHL también son compuestos estables, especialmente en ambientes con baja oxidación y bajas tasas de hidrólisis, lo que contribuye a su persistencia como contaminantes activos (Chang and Ren, 2015; Mitchell et al., 2015; Yin et al., 2018). En contraste, TER presenta una biodegradación rápida en condiciones aerobias (Yao et al., 2019), está clasificado como fácilmente biodegradable según la guía OECD 310 y, además, su mecanismo de acción generalizado reduce la probabilidad de generar resistencia en ecosistemas de agua dulce (Lewis and Ausubel, 2006).

Por su parte, los antibióticos, segundo componente de las SACTAs, suelen presentar valores de LC_{50} muy superiores a sus MIC, lo que indica una baja probabilidad de toxicidad aguda en contextos terapéuticos. Las concentraciones ambientales de antibióticos se sitúan comúnmente entre 1 y 15 µg/mL (Tahrani et al., 2016). Sin embargo, la exposición crónica a bajas dosis en el ambiente favorece la acumulación y puede generar efectos a largo plazo en las poblaciones microbianas acuáticas. Se ha demostrado, por ejemplo, que la exposición prolongada a CHL y FF altera la estructura de comunidades microbianas acuáticas (Lai et al., 2009). En peces, FF ocasiona disbiosis intestinal, disminuye la diversidad bacteriana y modifica el metabolismo hepático, lo que refleja su impacto ecológico sostenido (Qian et al., 2021). Asimismo, combinaciones de

antibióticos como CHL con otros antibióticos pueden potenciar la toxicidad mediante efectos aditivos o sinérgicos (Brosche and Backhaus, 2010).

Una ventaja fundamental de las SACTAs radica en que permiten reducir hasta en un 75% las dosis de antibióticos, lo que contribuye a disminuir la diseminación de genes de resistencia. Se ha reportado, por ejemplo, que la exposición a FF favorece la proliferación de bacterias resistentes y genes asociados a resistencia en ríos y microcosmos acuáticos, con consecuencias negativas para la ecología bacteriana de agua dulce (Gordon et al., 2007; Zhang et al., 2022). De manera similar, TC ha sido vinculado con la propagación de genes de resistencia (Roberts and Schwarz, 2016). En ríos suburbanos de China se han identificado genes de resistencia a TC (Jiang et al., 2013), mientras que genes relacionados con CHL y GTM se han detectado en muestras de agua de Alemania, Australia, China e Irán (Aali et al., 2019; Dang et al., 2008; Stoll et al., 2012; Wang et al., 2018). Estos hallazgos evidencian la amplia distribución de genes de resistencia en ecosistemas acuáticos y el desafío ambiental que representa la persistencia de antibióticos en aguas superficiales. En este contexto, la reducción de su liberación al medio ambiente sigue siendo prioritaria, y las SACTAs se perfilan como una estrategia viable al disminuir las concentraciones de antibióticos hasta aproximadamente un 12.5-25% de su MIC.

Capítulo 8
Discusión general de resultados

Capítulo 8 Discusión general de resultados

Este trabajo se enmarca en un contexto de creciente preocupación global por el uso excesivo de antibióticos y sus repercusiones sobre la salud humana, animal y ambiental. En las últimas décadas, la resistencia a los antimicrobianos ha aumentado de manera alarmante, constituyendo un desafío sanitario de alcance mundial. Organismos internacionales como la WHO y la FAO han advertido que, sin intervenciones eficaces, las infecciones causadas por bacterias resistentes podrían provocar millones de muertes y comprometer tratamientos médicos esenciales, como cirugías o trasplantes.

A este problema se suma el hecho de que los antibióticos empleados tanto en medicina como en la producción animal son, en gran parte, excretados y llegan al ambiente a través de aguas residuales y desechos agrícolas. Muchos de estos compuestos no son eliminados completamente por los tratamientos convencionales, lo que conlleva su acumulación en suelos y cuerpos de agua. Esta presencia ambiental genera efectos ecotoxicológicos sobre organismos no diana, altera comunidades microbianas y favorece la proliferación de bacterias resistentes.

Ante este panorama, resulta imprescindible desarrollar alternativas terapéuticas innovadoras, eficaces y sostenibles, que permitan preservar la eficacia de los antibióticos actuales sin comprometer el equilibrio ecológico. La búsqueda de soluciones que integren la protección de la salud con la del ambiente constituye hoy una prioridad para abordar de forma integral la crisis de resistencia antimicrobiana.

En este contexto, los productos naturales emergen como sustitutos o complementos potenciales, capaces de reducir la necesidad de antibióticos. Esta tesis, enmarcada en un enfoque "*One Health*", que integra salud humana, animal y ambiental, ha identificado compuestos naturales que poseen bajo impacto ecológico y gran potencial para ser utilizados como alternativas sostenibles al uso convencional de antibióticos.

El presente trabajo se inició con un amplio análisis de la toxicidad de antibióticos sintéticos, evidenciando que estos compuestos generan efectos adversos tanto en organismos bioindicadores como en comunidades bacterianas presentes en suelos y cuerpos de agua. Se constató una alteración negativa en la diversidad y funcionalidad microbiana, lo que puede comprometer procesos ecológicos clave. Estos hallazgos refuerzan la preocupación sobre el impacto ambiental de los antibióticos sintéticos y

subrayan la necesidad de desarrollar alternativas más sostenibles y menos perjudiciales para los ecosistemas.

A continuación, se realizó un cribado de diversos productos naturales seleccionados a partir de una amplia revisión bibliográfica, con el objetivo de identificar compuestos con potencial antimicrobiano. Esta etapa permitió evaluar la eficacia de distintas sustancias frente a los microorganismos de interés, destacando particularmente el TER y la HQ como los más prometedores. Ambos compuestos demostraron una actividad antimicrobiana notable, superior a la del resto de los productos analizados, posicionándolos como posibles alternativas naturales a los antibióticos convencionales.

Posteriormente, y aplicando la misma metodología utilizada para los antibióticos sintéticos, se evaluó la toxicidad ambiental del TER y la HQ. Los resultados mostraron que, si bien ambos compuestos presentaron una fuerte actividad antimicrobiana, la HQ evidenció una toxicidad ambiental considerablemente elevada, especialmente sobre organismos bioindicadores. Esta elevada toxicidad limita su viabilidad como alternativa ecosostenible, descartando su uso en contextos donde la protección ambiental es prioritaria.

Una vez establecido el perfil de toxicidad más favorable del TER, se procedió a analizar su efecto combinado con distintos antibióticos. Se identificaron seis combinaciones sinérgicas que permitieron reducir significativamente las dosis requeridas tanto de TER como del antibiótico para alcanzar una eficacia terapéutica óptima. Estas sinergias representan un enfoque prometedor para disminuir la toxicidad general del tratamiento y mitigar el desarrollo de resistencias, sin comprometer la efectividad clínica.

Finalmente, las combinaciones sinérgicas fueron evaluadas desde una perspectiva ecotoxicológica frente a organismos bioindicadores y comunidades microbianas acuáticas. Se observó una toxicidad variable según el antibiótico implicado, con una tendencia a mayor toxicidad en aquellas combinaciones con mayor proporción de TER. No obstante, en ningún caso se superó la toxicidad observada con el antibiótico utilizado en solitario a su concentración efectiva, lo que refuerza el potencial de estas combinaciones como estrategias terapéuticas más sostenibles desde el punto de vista ecológico.

8.1 Impacto ecotoxicológico y persistencia ambiental de los antibióticos

La evaluación ecotoxicológica realizada en este estudio evidenció que los antibióticos analizados ejercen efectos tóxicos de magnitud variable sobre organismos no diana, tanto acuáticos como terrestres. En particular, se observó una toxicidad moderada en *D. magna*, *A. fischeri* y *A. cepa*, lo que sugiere un riesgo potencial para especies representativas de diferentes niveles tróficos y compartimentos ambientales. En contraste, *E. fetida* mostró una toxicidad muy baja frente a los antibióticos evaluados, posiblemente debido a diferencias en mecanismos de absorción, metabolismo o sensibilidad fisiológica. Esta variabilidad en las respuestas toxicológicas resalta la importancia de utilizar múltiples bioensayos para comprender de manera más precisa el riesgo ambiental asociado a estos compuestos.

De manera consistente con lo reportado previamente en la literatura científica como se ha expuesto en el Bloque I, las tetraciclinas (como son CTC, OTC y TC), junto con el CHL, evidenciaron los mayores niveles de toxicidad frente a los indicadores acuáticos utilizados en este estudio. Un aporte relevante y novedoso de esta investigación radica en la cuantificación, por primera vez, de la ecotoxicidad de dichos compuestos sobre bioindicadores terrestres. En este contexto, *E. fetida* demostró una notable tolerancia, conservando su viabilidad incluso tras exposiciones superiores a 1000 µg/mL, lo cual sugiere una baja susceptibilidad de esta especie al efecto tóxico de los antibióticos evaluados. Por el contrario, *A. cepa* se presentó como un organismo sensible, especialmente ante la exposición a AMO y GTM, que mostraron una fitotoxicidad significativa en concentraciones cercanas a los 40 µg/mL.

Esto nos permite concluir que la presencia de residuos de antibióticos presenta una toxicidad moderada para el medio ambiente. Cabe destacar, además que los ensayos realizados en este estudio se enfocaron en la evaluación de efectos agudos de los antibióticos, con tiempos de exposición que variaron desde apenas 30 minutos en el caso de *A. fischeri* hasta un máximo de 14 días para *E. fetida*. Si bien este enfoque permite detectar respuestas inmediatas y relevantes a corto plazo, es importante considerar que muchos antibióticos presentan una elevada estabilidad química y una persistencia ambiental significativa. Esta durabilidad, junto con su uso continuo en contextos clínicos,

veterinarios y agrícolas, favorece su acumulación en distintos compartimentos ambientales. Como consecuencia, estos compuestos pueden ejercer efectos ecotoxicológicos a largo plazo, incluso cuando se encuentran en concentraciones subletales. En este sentido, la exposición crónica y la bioacumulación representan factores clave que podrían intensificar su impacto en organismos no diana, especialmente en aquellos con ciclos de vida largos o con funciones ecológicas sensibles.

Varios de los antibióticos evaluados en esta investigación presentan una elevada resistencia a los procesos naturales de degradación, lo que contribuye significativamente a su persistencia en el ambiente. Un caso representativo es el de la NMC, cuya notable estabilidad química en agua dentro de un amplio rango de pH (entre 2 y 9) le permite permanecer inalterada durante años (Simone and Popino 2006). Esta característica implica que su eliminación del medio acuático depende casi exclusivamente de la acción de comunidades microbianas especializadas capaces de degradarla activamente (Yang et al. 2025). De igual forma, las tetraciclinas (como son CTC, OTC y TC) muestran una estabilidad ambiental considerable, atribuida a su estructura química polifuncional, la cual favorece la formación de complejos estables (quelatos) con cationes metálicos presentes en el suelo y el agua. Este proceso de quelación reduce significativamente su biodisponibilidad y, en consecuencia, su susceptibilidad a la degradación tanto biótica como abiótica (Yao and Li 2023). Estudios previos han reportado vidas medias en suelos de entre 30 y 40 días para CTC y OTC (Li et al. 2010), lo que indica un potencial de acumulación que podría derivar en efectos ecotoxicológicos prolongados.

En relación con los procesos de fotodegradación, no todos los antibióticos presentan una sensibilidad significativa a la radiación solar, lo que contribuye a su persistencia ambiental. En particular, las sulfonamidas (como es SDZ) poseen una capacidad limitada para absorber luz dentro del espectro solar, lo que las convierte en compuestos fotopersistentes. Estudios recientes han demostrado que, bajo condiciones de radiación UV reducida como ocurre en invierno, la vida media de las sulfonamidas en agua puede extenderse hasta aproximadamente un mes (Kulik et al. 2023), aumentando así su potencial de acumulación en ambientes acuáticos. De manera similar, los antibióticos pertenecientes al grupo de los macrólidos, (como es ERY) también presentan una fotodegradación limitada. En experimentos realizados con luz solar simulada, se han observado semividas de varios días , mientras que en condiciones ambientales reales, se ha reportado una vida media superior a los 40 días en sistemas como lagunas de estiércol (Georgakakos et al. 2023).

Una vez liberados en el medio ambiente, muchos antibióticos muestran una marcada tendencia a adsorberse y acumularse en suelos y sedimentos, lo que prolonga significativamente su permanencia y reduce su movilidad. Esta retención está estrechamente vinculada a las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto, las cuales determinan su afinidad por la fase sólida del medio. En particular, las tetraciclinas destacan por su alta capacidad de adsorción, tanto a la materia orgánica como a minerales presentes en el suelo. Este comportamiento se explica por la formación de interacciones específicas como puentes iónicos, puentes de hidrógeno y complejos de quelación con cationes metálicos (Pollard et al. 2018). Como consecuencia, estos antibióticos quedan firmemente retenidos en la matriz sólida, lo que limita su biodisponibilidad para los microorganismos degradadores y, por ende, dificulta su eliminación natural. Esta fuerte adsorción puede extender considerablemente su vida media efectiva en el ambiente. Por ejemplo, se ha reportado que la tetraciclina puede permanecer en suelos ricos en materia orgánica durante periodos prolongados, alcanzando vidas medias de hasta aproximadamente 578 días (Bloor et al. 2021). Este fenómeno representa un riesgo ambiental a largo plazo, ya que los antibióticos retenidos en el suelo pueden actuar como fuentes de contaminación prolongadas en el tiempo.

Incluso aquellos antibióticos que, en condiciones experimentales, presentan una rápida degradación con vidas medias que oscilan entre días y pocas semanas, pueden comportarse como contaminantes pseudo-persistentes debido a su introducción continua en el medio ambiente. Esta pseudo-persistencia se debe a la constante entrada de estos compuestos desde múltiples fuentes, entre las que destacan las descargas de aguas residuales urbanas, los desechos provenientes de explotaciones ganaderas tratadas con antibióticos, y los efluentes generados por actividades relacionadas con la acuicultura. Un ejemplo representativo es el de los antibióticos β-lactámicos, (como son AMO, AMP y PENG), los cuales se caracterizan por una vida media relativamente corta en el agua de 6–7 días a 25 °C, debido a su alta susceptibilidad a procesos de hidrólisis (Mitchell et al. 2014). No obstante, la descarga continua de estos compuestos en entornos acuáticos, impide que sus niveles disminuyan significativamente, manteniéndose concentraciones prácticamente constantes en el medio (Kulik et al. 2023). De este modo, aunque algunos antibióticos no sean intrínsecamente persistentes desde el punto de vista químico, su uso intensivo y la falta de mecanismos de contención eficaces contribuyen a que se comporten como contaminantes de presencia sostenida.

Por tanto, además de los efectos letales evaluados en estudios de ecotoxicidad aguda, hay que considerar los efectos subletales que pueden generar los antibióticos sobre organismos acuáticos, incluso cuando no se observa un aumento directo en la mortalidad. Estos efectos, aunque menos evidentes, pueden afectar funciones vitales como la reproducción, el crecimiento y la fisiología, alterando de forma significativa la dinámica poblacional y la estabilidad ecológica.

En este sentido, diversos estudios han demostrado que exposiciones crónicas a concentraciones bajas de antibióticos pueden generar impactos sustanciales en *D. magna*. Particularmente, se ha observado que la reproducción es una de las funciones más sensibles a la exposición prolongada. En bioensayos de 21 días, muchos antibióticos han mostrado reducir significativamente la producción de crías a concentraciones considerablemente más bajas que las requeridas para provocar inmovilización aguda. Por ejemplo, la SDZ, presenta una Ec_{50} en reproducción de 13.7 mg/L, mientras que su Lc_{50} en 48 h se sitúa en torno a los 200 mg/L (Wollenberger et al. 2000). De manera similar, las tetraciclinas como la OTC y la TC muestran una Ec_{50} en ensayos de 21 días cercana a los 45 mg/L, revelando que los efectos subletales sobre la reproducción pueden manifestarse a concentraciones hasta 10 veces menores que las requeridas para inducir efectos agudos (Wollenberger et al. 2000). La magnitud de estos efectos subletales varía en función del tipo de antibiótico: mientras que tetraciclinas y sulfonamidas suelen inducir toxicidad moderada en *Daphnia*, ciertos aminoglucósidos han mostrado provocar alteraciones fisiológicas relevantes incluso a concentraciones más bajas de lo previsto (Lee et al. 2021).

En el caso de *A. fischeri*, los antibióticos CTC y OTC fueron los que mostraron mayor toxicidad entre todos los compuestos evaluados, con concentraciones inhibitorias de la bioluminiscencia cercanas a 25 mg/L. Estos valores son consistentes con los reportados previamente para TC en estudios similares (Backhaus and Grimme 1999) lo que refuerza la evidencia de que ciertos antibióticos pueden interferir rápidamente con el metabolismo bacteriano incluso a concentraciones relativamente bajas. La inhibición de la bioluminiscencia constituye un efecto subletal, ya que las bacterias no necesariamente mueren de forma inmediata, pero su metabolismo energético y funcional se ve alterado. Comparaciones entre las concentraciones ambientales detectadas de estos antibióticos y los umbrales de toxicidad establecidos para *V. fischeri* sugieren que, en condiciones reales, podrían ocurrir efectos directos sobre comunidades microbianas

naturales, alterando procesos ecológicos fundamentales como la descomposición de materia orgánica y los ciclos biogeoquímicos (Park and Choi 2008a).

En *E. fetida*, aunque los antibióticos evaluados no generaron una toxicidad aguda significativa a las concentraciones ensayadas, se identificaron diversos efectos subletales incluso a niveles más bajos. Entre ellos, se observaron alteraciones morfológicas, como modificaciones en el grosor corporal y la longitud de los individuos, así como respuestas conductuales como la evitación activa de suelos contaminados. Estos cambios reflejan un impacto funcional que, aunque no implica mortalidad inmediata, puede comprometer el bienestar del organismo y su papel ecológico en el suelo. Asimismo, se han documentado afectaciones en parámetros reproductivos, así como en niveles celulares y moleculares, incluyendo inducción de estrés oxidativo, daño en el ADN, inmunotoxicidad y alteraciones en la estructura del citoesqueleto (Dong et al. 2012b, Lin et al. 2012, Gao et al. 2015, Gao et al. 2016).

En *A. cepa*, diversos antibióticos han demostrado ejercer efectos citotóxicos y genotóxicos sobre las células meristemáticas de las raíces cuando se exponen a soluciones contaminadas, incluso a concentraciones relativamente bajas. La exposición crónica a antibióticos puede provocar una reducción significativa en la elongación de las raíces, lo que sugiere la presencia de interferencias en los procesos mitóticos, estrés oxidativo o daño al material genético (Andreeva et al. 2010, Reggiani and Laoreti 2000). Estos resultados reflejan el potencial de los antibióticos para afectar no solo organismos animales, sino también componentes vegetales de los ecosistemas, comprometiendo procesos fundamentales como la absorción de nutrientes, la fijación del suelo y el desarrollo vegetal en entornos agrícolas o naturales contaminados.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio evidencian que los antibióticos analizados ejercen un impacto significativo sobre las comunidades microbianas tanto acuáticas como edáficas, especialmente en ecosistemas fluviales y suelos expuestos a contaminación. Aunque ya existía evidencia previa sobre el efecto de ciertos antibióticos en la composición y diversidad de comunidades bacterianas, los hallazgos presentados en esta investigación confirman que dichos compuestos afectan de manera dosis-dependiente el crecimiento y el metabolismo microbiano en un rango de concentraciones entre 0.1 y 10 µg/mL. Esta sensibilidad microbiana a concentraciones ambientalmente relevantes resalta la vulnerabilidad de los procesos ecológicos que dependen de la actividad microbiana, como la descomposición de materia orgánica, el

reciclaje de nutrientes o la fijación de nitrógeno. El efecto fue particularmente más marcado en los microorganismos del suelo, donde se observaron pérdidas significativas en la capacidad metabólica. Además, se identificaron diferencias en los patrones de sensibilidad según el tipo de comunidad microbiana, con variaciones en los sustratos sobre los que se pierde actividad metabólica dependiendo de si se trata de comunidades acuáticas o terrestres.

A nivel microbiológico, la introducción de antibióticos en ecosistemas naturales como suelos, sedimentos y cuerpos de agua genera presiones selectivas que afectan profundamente la biodiversidad microbiana. Estas presiones, derivadas tanto de exposiciones agudas como crónicas, pueden favorecer la supervivencia de cepas resistentes y empobrecer la composición microbiana general. Diversos estudios han demostrado que la presencia de antibióticos en el ambiente provoca una disminución significativa en la diversidad microbiana y una reestructuración de las comunidades bacterianas (Pallecchi et al. 2008, Martinez 2009, Koike et al. 2007). Esta pérdida de diversidad no es meramente taxonómica, sino funcional, como se ha demostrado con los resultados de la presente tesis, con la desaparición de especies sensibles, se pierden funciones ecológicas específicas, como la degradación de compuestos complejos, la fijación de nitrógeno o la simbiosis con plantas. La literatura también documenta que la exposición a antibióticos reduce la actividad enzimática global de las comunidades microbianas, así como su tasa de crecimiento, lo que refleja una disminución de la biomasa microbiana activa (Grenni, Ancona and Barra Caracciolo 2018). Incluso a dosis bajas, en rangos sub-inhibitorios, los antibióticos pueden ejercer efectos persistentes al actuar como presiones evolutivas silenciosas. A concentraciones subletales, estos compuestos no eliminan directamente a los microorganismos, pero sí alteran la dinámica poblacional y seleccionan cepas con mecanismos de resistencia, generando cambios duraderos en la estructura y funcionalidad de las comunidades (Kümmerer 2003).

En definitiva, los antibióticos, en su condición de contaminantes emergentes, representan una amenaza ecológica compleja y en muchos casos subestimada, cuyo impacto va más allá de la mortalidad aguda tradicionalmente evaluada. La evidencia reunida en este estudio en concordancia con otros datos en bibliografía, pone de manifiesto la necesidad urgente de considerar los efectos subletales y crónicos que estos compuestos pueden generar, incluso a concentraciones bajas y ambientalmente detectables. La exposición prolongada a dosis sub-inhibitorias no solo compromete la

salud y la aptitud de organismos no diana, sino que también altera la estructura y funcionalidad de comunidades microbianas, afectando procesos ecológicos esenciales como el reciclaje de nutrientes, la estabilidad del suelo y el equilibrio trófico. Estas disrupciones funcionales, aunque menos visibles, pueden desencadenar consecuencias ecológicas acumulativas a largo plazo, subrayando la importancia de integrar las evaluaciones ecotoxicológicas realizadas a diferentes niveles.

Destacar además que, más allá del impacto ambiental de los antibióticos, su presencia en el medio ambiente supone una presión selectiva para la aparición y dispersión de genes de resistencia, lo cual no solo amenaza la salud de las comunidades microbianas naturales, sino que también representa un grave riesgo para la salud pública al facilitar la transferencia horizontal de resistencia hacia patógenos clínicamente relevantes.

Considerando los efectos tóxicos y persistentes que los antibióticos sintéticos pueden generar en el medio ambiente, se hace cada vez más urgente la exploración de alternativas terapéuticas más seguras y sostenibles, tales como el uso de antimicrobianos de origen natural, la aplicación de terapias basadas en fagos o péptidos antimicrobianos, así como el desarrollo de estrategias de uso racional y tecnologías para la remediación ambiental. Estas medidas resultan esenciales para mitigar los impactos negativos y avanzar hacia un modelo de manejo de la salud y del medio ambiente más equilibrado

8.2 Evaluación del terpineol como agente antimicrobiano natural de interés terapéutico

La búsqueda de compuestos antimicrobianos de origen natural como alternativa a los de síntesis ha cobrado particular relevancia en los últimos años. Uno de los hallazgos más destacados de la presente tesis se enmarca precisamente en esta línea: la identificación del TER como el compuesto natural con mayor eficacia antimicrobiana entre todos los analizados. Este resultado representa un aporte significativo, no solo por sus implicancias en el ámbito clínico, sino también por su potencial para reducir la presión ecológica asociada al uso indiscriminado de antibióticos convencionales. Tal como se

detalla en la Tabla 20, los valores de MIC del TER se sitúan en un rango de 0.25 a 2 mg/mL frente a las cepas bacterianas sensibles, lo que evidencia una actividad notable. Cabe destacar que dichos valores son coherentes con los reportados en investigaciones previas sobre otras cepas bacterianas, tal como se refleja en dicha tabla, lo cual, no solo valida la consistencia de los datos obtenidos, sino que también refuerza la relevancia del TER como una opción prometedora dentro del espectro de compuestos naturales con aplicación antimicrobiana.

Al ampliar el análisis comparativo a otros compuestos alcohólicos monoterpénicos estructuralmente similares al TER, se observa que los valores de MIC obtenidos en esta investigación resultan, en muchos casos, comparables o incluso inferiores a los reportados para dichos compuestos. Esta observación refuerza la hipótesis de que el TER posee una actividad antimicrobiana particularmente destacada dentro de su clase química. Por ejemplo, el linalool ha demostrado una MIC de 1 mg/mL frente a *E. coli* [ATCC 25922] (Wang et al. 2025), lo cual se alinea con los valores observados para el TER en este estudio. Sin embargo, otros trabajos han reportado MIC considerablemente más elevadas para el mismo compuesto, como 9.4 mg/mL frente a *E. coli* [ATCC 35218], de 18.8 mg/mL frente a *S. aureus* [ATCC 25923] (Krapež et al. 2024) y valores entre 2 y 4 mg/mL frente a *A. baumannii* [ATCC 17978 y 19606] (Alves et al. 2016). Por su parte, el geraniol, otro alcohol monoterpénico relevante, los valores de MIC reportados también resultan superiores a los obtenidos para el TER en esta investigación. Estudios previos han documentado MIC de 5.6 mg/mL frente a *E. coli* [ATCC 25922] y de 11.2 mg/mL frente a *S. aureus* [ATCC 25923] (Bhattamisra et al. 2018). Aunque debe reconocerse que los estudios sobre estos compuestos aún son limitados en número y presentan cierta heterogeneidad metodológica, los datos comparativos hasta ahora disponibles sugieren que el TER exhibe una eficacia antimicrobiana potencialmente mayor frente a diversas cepas bacterianas de interés clínico.

No obstante, al comparar la eficacia individual del TER con la de antibióticos sintéticos de uso común, se evidencia que este compuesto natural requiere concentraciones significativamente más elevadas para lograr niveles de inhibición bacteriana comparables. Tal como se detalla en el Anexo 2.2, los antibióticos CTC, OTC y TC presentan una alta efectividad frente a todas las cepas bacterianas evaluadas, situándose las MICs consistentemente por debajo de 0.01 mg/mL. En contraste, incluso los valores más prometedores de MIC obtenidos para el TER resultan considerablemente superiores y se sitúan en rangos que, en el contexto de los antibióticos convencionales,

serían considerados de baja eficacia. Comparativamente, estas diferencias marcan una clara desventaja del TER en cuanto a potencia inhibitoria, especialmente en el contexto de infecciones causadas por cepas sensibles a los antibióticos tradicionales.

Esta disparidad evidencia una limitación fundamental en la aplicación del TER como agente antimicrobiano individual: su eficacia, aunque significativa en términos relativos, no alcanza los estándares de actividad establecidos por los compuestos sintéticos de referencia. Este aspecto cobra especial importancia cuando se consideran escenarios clínicos en los que la rapidez y contundencia de la acción antimicrobiana son críticas. Así, si bien el TER muestra potencial como parte de enfoques terapéuticos alternativos o complementarios, los datos sugieren que su uso como sustituto directo de antibióticos convencionales requeriría formulaciones optimizadas o modificaciones estructurales que potencien su actividad sin comprometer su perfil de seguridad.

Suponiendo que la sensibilidad bacteriana observada *in vitro* se mantuviera *in vivo*, es posible realizar una estimación preliminar de la dosis de TER necesaria para alcanzar concentraciones terapéuticas eficaces en un paciente humano. Partiendo del valor más bajo de MIC registrado en este estudio (0.25 mg/mL frente a *A. baumannii*) y considerando que el mecanismo de acción bactericida del TER es dependiente de la concentración, la literatura sugiere que la concentración objetivo debería situarse en torno a 10 veces la MIC (Kashuba, Bertino and Nafziger 1998, Hodiamont et al. 2022), es decir, aproximadamente 2500 mg/L. Asumiendo un peso corporal estándar de 75 kg y un volumen de distribución de entre 0.6 y 1 L/kg (McNamara and Leggas 2009), el volumen total de distribución oscilaría entre 45 y 75 litros. En consecuencia, la cantidad total de TER requerida para alcanzar la concentración plasmática objetivo se situaría en un rango aproximado de 113 a 188 gramos. Esta cantidad representa una dosis excepcionalmente alta para administración sistémica, y es muy probable que supere los límites de seguridad farmacológica establecidos para este tipo de compuestos, especialmente si se consideran factores como la biodisponibilidad oral, la toxicidad hepática o los efectos adversos en sistemas sensibles.

Esta limitación no constituye un caso aislado, sino que responde a una problemática ampliamente documentada en el estudio de compuestos antimicrobianos de origen natural. Tal como se mencionó en la Introducción, numerosos metabolitos secundarios vegetales presentan una eficacia antimicrobiana aparente en condiciones *in vitro*, pero su potencial terapéutico real se ve reducido significativamente al ser

trasladados al contexto *in vivo*. Esta discrepancia se debe, en gran medida, a una serie de obstáculos fisicoquímicos que afectan negativamente su farmacocinética y farmacodinámica. Entre los factores más relevantes se encuentran la baja biodisponibilidad sistémica, la escasa solubilidad en medios acuosos y la limitada capacidad de atravesar las membranas celulares bacterianas, especialmente en cepas gram-negativas con envolturas externas complejas. Estas barreras limitan la llegada del compuesto al sitio intracelular de acción, reduciendo su eficacia inhibitoria incluso cuando las concentraciones *in vitro* parecen prometedoras. Además, la susceptibilidad del compuesto a procesos metabólicos y de eliminación rápida en el organismo puede acentuar aún más esta brecha entre eficacia experimental y aplicación clínica.

Si bien la actividad antimicrobiana del TER es considerablemente inferior a la de los antibióticos sintéticos tradicionales, este hecho no debe interpretarse como una descalificación de su valor terapéutico. Por el contrario, su potencial debe analizarse en el marco de enfoques terapéuticos integradores, que prioricen la combinación racional de compuestos con el objetivo de potenciar la eficacia global del tratamiento y, al mismo tiempo, mitigar los efectos adversos asociados al uso prolongado de antibióticos. En este contexto, la utilidad del TER no radica exclusivamente en su acción directa contra los patógenos, sino en su capacidad para actuar como modulador sinérgico, capaz de potenciar la actividad de otros antimicrobianos o reducir las concentraciones requeridas de estos.

8.3 Perfil ecotoxicológico del terpineol: implicaciones para su uso como alternativa antimicrobiana

A partir de los datos presentados en el Bloque 3 de resultados, se evidencia con claridad que la HQ presenta un perfil ecotoxicológico significativamente más negativo en comparación con el TER, lo que sugiere un mayor impacto ambiental por parte de la primera. Sin embargo, aunque el TER demuestra ser menos perjudicial desde el punto de vista ecotoxicológico que la HQ, su aceptación como una alternativa segura y viable a los antibióticos convencionales no debe asumirse de forma inmediata. De hecho, en los ensayos realizados, el TER presentó una toxicidad superior a la de los antibióticos sintéticos evaluados en organismos indicadores indicadores, lo que también obliga a

examinar con mayor detenimiento su perfil de seguridad ambiental. Por ejemplo, el valor de Ec_{50} del TER en *D. magna* es de 51.23 (44.66-57.49) µg/mL, mientras que, en el caso de diversos antibióticos, los valores superaron los 200 µg/mL, sin observarse efectos tóxicos en algunos de ellos incluso a concentraciones superiores a 2500 µg/mL. Esto indica una mayor sensibilidad de dichos organismos ante la exposición al TER, lo cual debe ser considerado en su evaluación ambiental integral.

Este resultado subraya un aspecto crucial en la evaluación de alternativas terapéuticas: el hecho de que un compuesto sea de origen natural no implica, de manera automática, una menor toxicidad ambiental. Por tanto, la presunción de inocuidad basada únicamente en el origen natural del compuesto puede resultar engañosa y debe ser evitada.

Ahora bien, es importante contextualizar estos resultados de laboratorio en relación con su aplicabilidad en condiciones reales. Los niveles de toxicidad observados en bioensayos controlados no necesariamente reflejan la toxicidad efectiva en entornos naturales. En estos ensayos, el TER se mantiene en contacto constante con los organismos, maximizando su biodisponibilidad y, por tanto, su efecto tóxico. En contraste, en condiciones ambientales reales, su comportamiento fisicoquímico limita considerablemente la exposición efectiva.

Por ello, esta tesis planteó un estudio novedoso de ecotoxicidad no solo basado en indicadores individuales sino en comunidades microbianas, bases de las cadenas tróficas tanto de ríos como edáficas lo cual da una diagnosis más realista de cuál podría ser el efecto de estos productos naturales en el medio ambiente. Tal como se evidencia en las tablas 14 y 23, el TER mostró una menor toxicidad que los antibióticos sobre comunidades bacterianas no patógenas, lo cual podría ser considerado un punto a favor desde una perspectiva microbiológica ambiental. Sin embargo, esta ventaja se ve contrarrestada por los resultados obtenidos con organismos indicadores de distintos niveles tróficos, en los que los valores de Ec_{50} fueron consistentemente menores.

El TER presenta una solubilidad acuosa moderada (National Center for Biotechnology Information, 2025f), y posee una volatilidad apreciable (Moreira et al. 2001). Estas características favorecen su dispersión fuera del medio acuoso, ya sea mediante evaporación a la atmósfera o por adsorción a partículas del suelo y materia orgánica (Hartanto et al. 2017). Como resultado, su concentración libre en el medio se

reduce, disminuyendo la posibilidad de interacción directa con los organismos no diana. En consecuencia, es razonable suponer que, en entornos naturales, los niveles de exposición al TER serían considerablemente menores que los empleados en laboratorio, lo que mitigaría en gran medida sus efectos tóxicos in situ.

Además de su limitada disponibilidad ambiental, otra característica que reduce su riesgo ecológico es su baja persistencia. A diferencia de muchos antibióticos sintéticos, cuya estabilidad química les confiere una permanencia prolongada en los ecosistemas (como se analizó en el apartado 8.1), el TER presenta una estructura molecular que favorece su degradación. En particular, la presencia de dobles enlaces en su estructura facilita su reacción con especies reactivas presentes en la atmósfera, especialmente con radicales hidroxilos (-OH). Esta alta reactividad contribuye a una vida media atmosférica relativamente corta, estimada en aproximadamente 3 horas (Wells 2005).

Esta degradación rápida no se limita al medio atmosférico. En suelos y sedimentos, el TER también muestra una alta biodegradabilidad, siendo metabolizado eficientemente por la microbiota edáfica. Estudios previos han documentado una degradación sustancial en plazos cortos, atribuida a la capacidad de los microorganismos del suelo para reconocer y procesar su estructura química (Misra et al. 1996). Esta facilidad de degradación se explica en parte por el carácter biogénico del terpineol, ya que, al tratarse de un compuesto naturalmente presente en diversas especies vegetales, su estructura molecular resulta familiar para las rutas metabólicas microbianas comunes, lo que permite su integración eficiente en los ciclos biogeoquímicos del carbono y otros elementos (Rogowska-van der Molen et al. 2023).

Como resultado de su baja persistencia y alta degradabilidad, el TER no cumple con los criterios establecidos para clasificarse como una sustancia persistente, bioacumulativa y tóxica bajo los estándares de evaluación ambiental reconocidos internacionalmente (Api et al. 2024). Esta característica representa una ventaja relevante frente a muchos compuestos sintéticos, incluidos varios antibióticos, que sí presentan estas propiedades y suponen un riesgo considerable de acumulación en el medio ambiente y afectación a largo plazo de los ecosistemas (Huang et al. 2025).

El bajo riesgo de acumulación del TER también se refleja en su comportamiento bioquímico. Debido a su naturaleza química y a su moderada hidrofobicidad (log Kow

2.67) (National Center for Biotechnology Information, 2025f), el TER no tiende a acumularse de forma significativa en tejidos biológicos. Este valor se sitúa por debajo del umbral generalmente aceptado para considerar una sustancia como bioacumulativa, lo que ha llevado a su exclusión de dicha categoría según los criterios ecotoxicológicos estándar (Api et al. 2024). En comparación, muchos antibióticos presentan una mayor afinidad por tejidos lipídicos y pueden generar efectos subletales por acumulación progresiva, incluso a bajas concentraciones. Además, existen evidencias de que ciertos antibióticos liberados al ambiente son susceptibles a procesos de bioacumulación y biomagnificación, incrementando su concentración a medida que ascienden en la cadena trófica (Zhang et al. 2018d, Kobayashi et al. 2005, Kim et al. 2014).

En conjunto, estos factores permiten reinterpretar los datos de toxicidad aguda obtenidos en laboratorio. Si bien los ensayos experimentales indicaron que el TER puede ser más tóxico que algunos antibióticos en condiciones controladas, es poco probable que este nivel de toxicidad se mantenga en entornos naturales. La combinación de baja persistencia, rápida degradación química y biológica por parte de las comunidades microbianas, y escaso potencial de bioacumulación sugiere que el TER no representa un riesgo ecológico significativo bajo condiciones ambientales reales. Esta conclusión enfatiza la necesidad de interpretar con cautela los resultados de laboratorio y de complementarlos con estudios en condiciones semi-naturales o de campo que reflejen con mayor fidelidad el comportamiento ambiental del compuesto.

8.4 Interacciones sinérgicas entre terpineol y antibióticos

En el contexto de los resultados ecotoxicológicos discutidos en el apartado anterior, donde se evidenció que el TER probablemente no represente un riesgo ambiental significativo en condiciones reales, adquiere aún más relevancia su potencial como agente coadyuvante en terapias antimicrobianas. Este valor añadido no se limita a su perfil ecológico favorable, sino que se extiende a su capacidad para potenciar la eficacia de antibióticos sintéticos cuando se administra en combinación.

En línea con esta premisa, uno de los hallazgos más significativos y prometedores de esta investigación fue precisamente la identificación de seis combinaciones sinérgicas entre el TER y diferentes antibióticos convencionales, en las cuales se observó una

reducción sustancial en la MIC necesaria del antibiótico para lograr un efecto antimicrobiano efectivo. Este incremento en la actividad se atribuye, probablemente, a la capacidad del TER de alterar la integridad de la membrana celular, lo que facilitaría la entrada de los antibióticos y potenciaría su acción (Kaur et al. 2021, Simões et al. 2009, Vattem et al. 2005, Oyedemi et al. 2009). Esta mejora no se restringe a una ganancia cuantitativa en eficacia, sino que representa también una ventaja cualitativa con implicaciones directas en la gestión de la resistencia bacteriana, uno de los mayores desafíos actuales en salud pública.

Como se expuso previamente en el apartado de Antecedentes, la proliferación de cepas bacterianas multirresistentes ha sido alimentada en gran parte por el uso indiscriminado, prolongado y muchas veces innecesario de antibióticos de amplio espectro. En este escenario, las combinaciones sinérgicas surgen como una estrategia innovadora para contrarrestar este problema. Al permitir reducir la dosis efectiva del antibiótico sin comprometer su eficacia, estas formulaciones disminuyen significativamente la presión selectiva sobre las poblaciones microbianas.

Este menor grado de presión selectiva, a su vez, se traduce en una reducción en la probabilidad de aparición, persistencia y diseminación de genes de resistencia, contribuyendo así a preservar la eficacia clínica de los antimicrobianos existentes. Desde esta perspectiva, el uso combinado con compuestos naturales no solo optimiza el rendimiento de los antibióticos disponibles, sino que también ofrece una alternativa sostenible al desarrollo continuo de nuevos fármacos (Matthew J Cheesman 2017). A pesar de la limitada disponibilidad de estudios experimentales sobre combinaciones específicas entre alcoholes monoterpénicos (como el TER) y antibióticos sintéticos, los hallazgos aquí presentados coinciden con hipótesis planteadas en la literatura científica para otros metabolitos secundarios.

En particular, estas hipótesis sugieren que ciertos compuestos naturales, especialmente aquellos presentes en aceites esenciales, podrían potenciar la actividad antibiótica a través de mecanismos de acción complementarios. Por lo tanto, el efecto sinérgico observado no se explicaría por una única interacción bioquímica, sino por una combinación de procesos convergentes que afectan distintos niveles funcionales de la célula bacteriana (Pérez-Flores et al. 2025, Chouhan, Sharma and Guleria 2017, Alam et al. 2022).

Siguiendo esta línea, compuestos monoterpénicos como el linalool han demostrado un potencial notable para establecer sinergias con diversos antibióticos. En estudios recientes, se ha documentado su sinergia con colistina frente a múltiples cepas de *A. baumannii*, incluyendo cepas resistentes lo cual pone de manifiesto su utilidad incluso en escenarios clínicos caracterizados por opciones terapéuticas limitadas. Asimismo, se ha reportado la acción sinérgica del linalool con GTM frente a *S. aureus* [ATCC 33591], con TC frente a *P. aeruginosa* [ATCC 27853], y en combinación con ERY y TC frente a *E. coli* [ATCC 25922] (Aelenei et al. 2019). Las investigaciones han propuesto que el principal mecanismo subyacente a estas interacciones sinérgicas reside en la capacidad del linalool para alterar la integridad y permeabilidad de la membrana celular bacteriana. Al comprometer la estructura de la bicapa lipídica, el compuesto facilita la penetración de antibióticos en el interior de la célula, lo que incrementa la concentración intracelular del fármaco y su eficacia al alcanzar sus dianas moleculares específicas (Kohanski, Dwyer and Collins 2010). Esta explicación resulta altamente coherente con los hallazgos obtenidos en esta tesis en relación con el TER, particularmente en las cepas de *S. agalactiae*, *A. baumannii* y *S. aureus*. En estos casos, las combinaciones sinérgicas entre el TER y determinados antibióticos no solo inhibieron eficazmente el crecimiento bacteriano, sino que además condujeron a una erradicación más eficiente de las poblaciones, indicando una afectación profunda de la viabilidad celular.

Más allá de su capacidad para potenciar la actividad antimicrobiana, la investigación desarrollada en esta tesis reveló un hallazgo adicional de gran relevancia: la combinación del TER con antibióticos no solo mejora la eficacia del tratamiento, sino que también puede influir positivamente en la dinámica de aparición de resistencias bacterianas. Este aspecto es crucial en un contexto global donde la resistencia a los antimicrobianos representa una amenaza creciente para la salud pública y la eficacia terapéutica de los fármacos existentes.

En este sentido, el TER empleado de manera aislada demostró un bajo potencial para inducir resistencia bacteriana en comparación con los antibióticos convencionales alcanzando incrementos máximos de 4MIC y 32MIC respectivamente. Esta diferencia puede explicarse en parte por su mecanismo de acción inespecífico, centrado principalmente en la disrupción de la membrana celular (Oyedemi et al. 2009). A diferencia de los antibióticos que actúan sobre dianas moleculares específicas y cuya acción puede ser contrarrestada eficazmente mediante mutaciones puntuales, el efecto

del TER compromete múltiples funciones celulares simultáneamente. Esta complejidad reduce la probabilidad de que una sola mutación bacteriana pueda conferir resistencia funcional frente a su acción.

Durante los ensayos se observaron ligeros aumentos en la respuesta al TER en algunas cepas. Será necesario realizar estudios adicionales para esclarecer si estos cambios corresponden a fenómenos de tolerancia o de resistencia. No obstante, los incrementos fueron considerablemente menores y menos frecuentes que los detectados frente a antibióticos como GTM, FF, CHL y TC. Estos últimos, por su alta especificidad, suelen favorecer el desarrollo de resistencias mediante mecanismos bien caracterizados, como modificaciones en sitios de unión (Chambers 1999), producción de enzimas inactivadoras (Husna et al. 2023), sobreexpresión de bombas de eflujo (Lorusso et al. 2022) o modificaciones metabólicas celulares (Miller et al. 2014).

De igual forma, las combinaciones terapéuticas evaluadas en esta tesis también redujeron la presión selectiva ejercida sobre las poblaciones bacterianas en comparación con el uso individual de antibióticos a dosis más elevadas. Al permitir una disminución significativa en la concentración necesaria del antibiótico para alcanzar un efecto terapéutico eficaz (comprendida entre el 75 y el 87.5% de reducción), las sinergias contribuyeron a limitar la aparición y selección de mutantes resistentes.

La acción conjunta del TER y los antibióticos no solo potencia el efecto bactericida o bacteriostático, sino que además introduce una barrera evolutiva más compleja. Al dirigirse simultáneamente a diferentes blancos celulares, esta estrategia terapéutica obliga a las bacterias a desarrollar múltiples mecanismos de adaptación de forma simultánea. Esta exigencia evolutiva reduce significativamente la probabilidad de que surjan variantes resistentes viables y sostenibles en el tiempo (Hemaiswarya et al. 2008, Álvarez-Martínez et al. 2020).

En conjunto, los hallazgos microbiológicos obtenidos en este estudio confirman que, si bien el TER no posee el perfil necesario para actuar como agente terapéutico único, sí representa una herramienta altamente prometedora y sostenible en el diseño de estrategias antimicrobianas combinadas. Su incapacidad para sustituir por completo a los antibióticos sintéticos se ve compensada por su notable capacidad de actuación como coadyuvante terapéutico. En particular, su efecto potenciador sobre la eficacia de

antibióticos convencionales, evidenciado por la significativa reducción de la MIC, lo posiciona como un candidato ideal para la optimización de tratamientos existentes.

Este potencial es especialmente valioso frente a cepas bacterianas multirresistentes, donde las opciones terapéuticas son cada vez más limitadas. Al reducir la dosis efectiva del antibiótico necesario para alcanzar la inhibición o erradicación bacteriana, el TER no solo mejora la eficacia del tratamiento, sino que también contribuye a mitigar el riesgo de aparición de nuevas resistencias, prolongando así la vida útil de los antibióticos actualmente disponibles. Por tanto, el uso combinado de TER y antimicrobianos sintéticos podría integrarse en estrategias de manejo racional de antibióticos, aportando tanto beneficios clínicos como ventajas desde el punto de vista de la salud pública.

No obstante, es importante reconocer que la respuesta observada a las combinaciones TER-antibiótico no fue homogénea entre las distintas cepas bacterianas evaluadas. A pesar de los resultados alentadores en varias combinaciones, se detectaron patrones de sensibilidad divergentes, incluso entre bacterias pertenecientes al mismo grupo de tinción de Gram. Esta variabilidad sugiere que la eficacia de las sinergias no responde a una regla general, sino que depende de una compleja interacción de factores biológicos y moleculares.

Entre los principales elementos que condicionan el efecto sinérgico se encuentran el tipo específico de microorganismo, el perfil genético de la cepa, la clase de antibiótico empleado y, especialmente, los mecanismos de resistencia presentes. Estos factores pueden modificar sustancialmente la capacidad del TER para potenciar la acción del antibiótico, ya sea impidiendo su acción en la célula o alterando las respuestas defensivas de la bacteria.

En consecuencia, la acción sinérgica entre TER y antibióticos no debe considerarse un fenómeno universalmente aplicable, sino un proceso contexto-dependiente que requiere una caracterización detallada caso por caso. Esta constatación subraya la necesidad de realizar estudios específicos para cada combinación de interés, con el fin de identificar no solo aquellas asociaciones más efectivas, sino también los escenarios clínicos y microbiológicos en los que su uso sería más pertinente.

Por tanto, aunque los resultados obtenidos en esta investigación son alentadores y representan un aporte significativo al campo de la terapéutica antimicrobiana, también revelan importantes limitaciones que deben ser abordadas mediante investigaciones futuras. La evidencia experimental aquí presentada establece una base sólida para considerar al TER como un coadyuvante eficaz en terapias combinadas, pero su aplicabilidad clínica aún requiere validación más allá del laboratorio. Será indispensable llevar a cabo estudios adicionales, tanto *in vitro* como *in vivo*, que contemplen una mayor diversidad de cepas clínicas, incluyan condiciones fisiológicas que reflejen de manera más realista el entorno del huésped, y utilicen modelos de infección más complejos y representativos. Asimismo, resultará fundamental realizar estudios preclínicos de toxicidad que permitan evaluar la seguridad del TER y sus combinaciones antes de considerar su aplicación terapéutica.

8.5 Evaluación ecotoxicológica de combinaciones terapéuticas basadas en terpineol y antibióticos

Uno de los principales aportes de esta tesis al conocimiento científico radica en la incorporación de una evaluación ambiental integral que considera el efecto toxicológico tanto sustancias individuales como el de sus combinaciones sinérgicas con eficacia antimicrobiana demostrada. Este enfoque busca garantizar no solo la eficacia clínica de las nuevas terapias, sino también su sostenibilidad ecológica. En este contexto, los resultados obtenidos sobre la toxicidad ambiental de las combinaciones entre TER y antibióticos revelan una elevada complejidad, que demanda análisis detallados para una correcta interpretación.

En términos generales, las combinaciones antimicrobianas evaluadas mostraron mayor toxicidad que los antibióticos aplicados individualmente en organismos acuáticos modelo como *D. magna* y *A. fischeri*. Este incremento en la toxicidad podría explicarse por efectos acumulativos derivados de la exposición simultánea a múltiples sustancias o debido a interacciones químicas imprevistas entre los componentes activos, que podrían potenciar significativamente sus efectos adversos (Liess, Henz and Shahid 2020). Sin embargo, es importante destacar que no todas las combinaciones manifestaron el mismo nivel de toxicidad. De hecho, aquellas mezclas que lograron una elevada actividad

antimicrobiana utilizando concentraciones relativamente bajas del producto natural presentaron una toxicidad notablemente menor en comparación con aquellas que requirieron concentraciones más elevadas. Por lo tanto, la reducción de la cantidad necesaria de producto natural aparece como un factor clave y estratégico para mitigar considerablemente el impacto ambiental asociado al posible empleo de estas combinaciones terapéuticas.

Adicionalmente, los ensayos predictivos realizados sobre estos organismos acuáticos evidenciaron una marcada variabilidad en la naturaleza de las interacciones toxicológicas entre las combinaciones evaluadas, observándose efectos sinérgicos, aditivos e incluso antagónicos según el tipo de mezcla y las concentraciones empleadas. Esta diversidad de respuestas biológicas pone de manifiesto la complejidad de la evaluación de mezclas químicas y la dificultad de anticipar de forma precisa su impacto ambiental. Además, sugiere que los mecanismos de acción entre los compuestos pueden variar sustancialmente según factores contextuales, lo que complica el establecimiento de patrones generalizables.

Especial atención merece la evaluación del impacto de las combinaciones antimicrobianas sobre comunidades microbianas naturales en ecosistemas fluviales, dada la complejidad intrínseca de estos sistemas ecológicos y la gran diversidad funcional que albergan.

En este contexto, el análisis de comunidades microbianas complejas y diversas mostró que las SACTAs ejercen un efecto considerablemente menos perjudicial que los antibióticos empleados de forma individual. Los ensayos de toxicidad, basados en parámetros de crecimiento y en el perfil metabólico de comunidades microbianas de río, evidenciaron que dichas combinaciones dieron lugar únicamente a interacciones aditivas o antagónicas, sin manifestarse efectos sinérgicos, y que su nivel de toxicidad resultó comparable o incluso inferior al observado con los antibióticos a su MIC.

Hay que considerar que, a diferencia de los ensayos realizados con organismos individuales, las comunidades microbianas responden de manera altamente dinámica, influenciadas no solo por factores ambientales como la temperatura, el pH o la disponibilidad de nutrientes, sino también por las interacciones competitivas, cooperativas y tróficas que se establecen entre distintas especies. Esta variabilidad dificulta considerablemente la extrapolación directa de los resultados obtenidos en

condiciones controladas de laboratorio a escenarios reales, donde los factores bióticos y abióticos pueden modificar sustancialmente la respuesta a las combinaciones evaluadas (Wu et al. 2019).

No obstante, el equipo de investigación ha tomado las muestras requeridas en el mismo punto en varias ocasiones, lo que permite contar con un registro taxonómico fiable. Si bien es cierto que se observan variaciones puntuales entre muestreos, en términos generales la estructura de la comunidad se mantiene estable y es coherente con lo que se esperaría en un río europeo con las características del suelo de la zona. La composición taxonómica, tanto a nivel de Familias como de Órdenes, refuerza esta representatividad, lo que respalda la validez del sitio como referencia ecológica dentro del contexto regional. (Janssen Peter 2006, Spain, Krumholz and Elshahed 2009). Por tanto, los datos obtenidos en esta investigación indican que ciertas mezclas, aunque muestran una toxicidad aparente más elevada en bioensayos estándar, pueden ejercer efectos equivalentes o incluso notablemente menores que los antibióticos convencionales cuando se aplican en concentraciones eficaces reducidas.

Estos resultados apuntan a que el uso de combinaciones sinérgicas no solo mantiene la eficacia terapéutica esperada, sino que también representa una estrategia ambientalmente más sostenible para las comunidades microbianas naturales, al permitir una reducción significativa de la carga total de compuestos antimicrobianos liberada en los ecosistemas acuáticos. Esta disminución en la cantidad de sustancias activas liberadas al ambiente contribuye a mitigar riesgos asociados tanto a la persistencia de contaminantes en el medio como al desarrollo y propagación de resistencia microbiana, favoreciendo un uso más responsable y seguro de las terapias antimicrobianas.

La comparación directa entre las combinaciones TER-antibióticos y el uso exclusivo de antibióticos presenta limitaciones importantes, ya que en el contexto de mezclas liberadas al medio acuático surge inevitablemente la cuestión de cómo cada sustancia puede modificar la biodisponibilidad de la otra. La presencia simultánea de TER u otros componentes derivados de aceites esenciales podría alterar procesos como la solubilidad, la adsorción a sedimentos, la degradación química o biológica y la movilidad de los antibióticos en el ecosistema. Aunque la literatura específica sobre estas interacciones es aún escasa, el conocimiento disponible acerca de las propiedades fisicoquímicas de ambos tipos de compuestos permite anticipar varios posibels escenarios.

Por un lado, considerando que el TER es un compuesto orgánico apolar con baja miscibilidad en agua, su presencia en el medio acuático tiende a generar microemulsiones (Curbelo et al. 2021). Estas microestructuras pueden comportarse como cosolventes orgánicos a pequeña escala, modificando la solubilidad aparente de antibióticos con carácter hidrofóbico (Lo, Lee and Chen 2016). Por ejemplo, moléculas lipofílicas como ciertos macrólidos (como la ERY) han demostrado experimentar un proceso de partición preferencial hacia estas gotículas de TER dispersas en el agua (Lee 2020). En consecuencia, la cantidad total de antibiótico dispersa podría aumentar debido a su incorporación en la fase oleosa. Este fenómeno podría tener implicaciones relevantes tanto en la biodisponibilidad del antibiótico para los microorganismos objetivo como en su transporte, degradación y eventual acumulación en los ecosistemas acuáticos.

De manera alternativa, cuando se trata de antibióticos altamente polares, el TER puede interaccionar con estas moléculas a través de procesos de adsorción en la interfaz de sus microemulsiones. En consecuencia, la distribución del antibiótico entre la fase acuosa y las fases orgánicas podría modificarse sustancialmente (Cheow and Hadinoto 2010). Este fenómeno tiene implicaciones directas sobre la biodisponibilidad del compuesto para los organismos acuáticos; si una fracción significativa del antibiótico queda englobada en las gotículas del TER, su concentración libre en el agua disminuiría, reduciendo potencialmente la toxicidad ambiental inmediata y la exposición directa de las bacterias acuáticas al fármaco (Adepu and Ramakrishna 2021).

Por todo lo expuesto, aunque la toxicidad aguda de las SACTAs pueda resultar en ciertos casos ligeramente superior a la observada para los antibióticos administrados individualmente en organismos bioindicadores, la reducción significativa en la carga global de antibióticos liberada al ambiente y la incorporación de un compuesto natural, biodegradable y potencialmente menos persistente en los ecosistemas acuáticos posicionan a estas combinaciones como una estrategia claramente ventajosa. Desde la perspectiva de la sostenibilidad ambiental y la gestión responsable del uso de antimicrobianos, las SACTAs ofrecen un enfoque innovador que permite mantener la eficacia terapéutica deseada mientras se minimizan los riesgos ecológicos asociados a la acumulación y persistencia de fármacos sintéticos.

Este planteamiento podría contribuir no solo a una reducción en la presión selectiva que favorece la resistencia microbiana, sino también a la protección a largo

plazo de las funciones ecológicas esenciales en los ecosistemas acuáticos, consolidándose, así como una herramienta prometedora en la búsqueda de terapias antimicrobianas más seguras y sostenibles. No obstante, como se ha puesto de manifiesto en el bloque de resultados, las referencias bibliográficas disponibles para realizar comparaciones directas siguen siendo limitadas, lo que subraya la necesidad de estudios adicionales que profundicen en estas interacciones.

8.6 Integración de eficacia clínica y seguridad ambiental en el enfoque *One Health*

La evaluación conjunta de compuestos naturales desde la perspectiva microbiológica y ambiental muestra que es posible diseñar combinaciones con buena eficacia antimicrobiana y un impacto ecológico aceptable. Al incluir antibióticos de uso humano y veterinario, este estudio se alinea con el enfoque "One Health", integrando salud humana, animal y ambiental. Así, se avanza hacia terapias más racionales y sostenibles, en las que el control de infecciones se concibe dentro de una visión amplia que conecta la eficacia clínica con la protección de los ecosistemas.

El TER se perfila como un candidato especialmente prometedor a formar parte de las combinaciones con antibióticos sintéticos. Su capacidad para potenciar la acción de los antibióticos permite reducir de manera significativa las dosis requeridas de éstos, disminuyendo la presión selectiva que favorece la aparición de resistencias bacterianas y reduciendo, a la vez, el impacto sobre los ecosistemas acuáticos. Estos resultados muestran que es posible compatibilizar el control eficaz de infecciones con la protección de las comunidades microbianas beneficiosas y con una menor liberación de compuestos antimicrobianos al medio, contribuyendo a evitar la acumulación de contaminantes y la alteración de funciones ecológicas esenciales.

En conjunto, esta tesis sienta las bases científicas para una reorientación profunda de las estrategias antimicrobianas, proponiendo un modelo en el que la eficacia clínica y la sostenibilidad ambiental no sean objetivos excluyentes, sino dimensiones complementarias entre el sistema sanitario y el medio ambiente. Los resultados obtenidos abren la puerta al desarrollo de combinaciones validadas tanto desde el punto

de vista microbiológico como ambiental, y marcan un paso firme hacia una medicina verdaderamente alineada con los principios del enfoque global "*One Health*", donde la salud humana, la salud animal y la integridad de los ecosistemas se entienden y protegen como partes de un todo indivisible.

Más allá del marco experimental, los hallazgos de esta tesis apuntan también a una posible aplicabilidad práctica de las combinaciones más prometedoras. En el ámbito clínico humano y veterinario, la capacidad de ciertos compuestos naturales para potenciar la actividad de antibióticos convencionales podría facilitar la incorporación de terapias combinadas que mantengan la eficacia terapéutica empleando dosis menores, reduciendo así tanto los efectos secundarios como la presión selectiva asociada al uso continuado de antimicrobianos. Asimismo, en el sector de la producción animal, estas combinaciones podrían contribuir a disminuir la dependencia del uso profiláctico de antibióticos, favoreciendo estrategias más prudentes y alineadas con las recomendaciones internacionales para el control de resistencias. Aunque la traslación a la práctica requiere validación adicional, los resultados obtenidos ofrecen un marco conceptual sólido para explorar intervenciones que, sin comprometer la salud humana o animal, permitan avanzar hacia sistemas productivos más sostenibles y coherentes con los principios del enfoque "One Health".

8.7 Limitaciones de la investigación llevada a cabo

A pesar de los aportes significativos de este trabajo, es necesario reconocer una serie de limitaciones que condicionan el alcance e interpretación de los resultados obtenidos. Estas limitaciones se pueden agrupar en cuatro grandes ejes: metodológicos, de extrapolación ambiental, de aplicabilidad clínica y de generalización.

8.7.1 Limitaciones metodológicas

Los experimentos se realizaron principalmente en condiciones controladas en el laboratorio, lo cual, si bien permitió obtener resultados reproducibles, no refleja plenamente la complejidad de los ecosistemas naturales en los ensayos toxicológicos ni las condiciones fisiológicas de un organismo superior huésped en el caso de los ensayos

microbiológicos. Asimismo, los bioensayos se centraron en efectos agudos y de corta duración, lo que restringe la evaluación de impactos crónicos, acumulativos o subletales. De igual forma, el número de organismos bioindicadores y cepas bacterianas empleados fue limitado, lo que reduce la representatividad ecológica y clínica de los hallazgos. En algunos casos, la comparación con la literatura estuvo condicionada por la heterogeneidad metodológica existente entre estudios previos.

8.7.2 Limitaciones en la extrapolación ambiental

Los rangos de concentración ensayados no siempre se correlacionan con las concentraciones ambientales reales reportadas en suelos, aguas y sedimentos. Además, no se incorporaron de manera experimental procesos de biodisponibilidad, adsorción, degradación o fotoestabilidad, que determinan en gran medida el destino final de los compuestos. Otro aspecto relevante es que los ensayos se realizaron con sustancias aisladas o en combinaciones definidas, mientras que en condiciones ambientales reales suelen coexistir mezclas complejas de antibióticos y otros contaminantes, generando interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas difíciles de predecir. Finalmente, no se evaluó la toxicidad de metabolitos de degradación, los cuales podrían presentar perfiles ecotoxicológicos diferentes a los compuestos parentales.

8.7.3 Limitaciones en la aplicabilidad clínica

En el caso del TER, su potencia relativa frente a antibióticos sintéticos resultó considerablemente menor, requiriendo dosis *in vivo* potencialmente tóxicas y farmacológicamente inviables. Asimismo, aunque se observó un prometedor efecto sinérgico con antibióticos, este fue validado solo en sistemas *in vitro* y con un número restringido de cepas sin conocer el mecanismo de acción que poseen dichas sinergias. La posible traslación de estas combinaciones a entornos reales plantea desafíos prácticos adicionales ya que sería necesario realizar ensayos preclínicos más exhaustivos que confirmen no solo su eficacia sino también su seguridad; además, la estabilidad de las formulaciones mixtas podría verse comprometida por la naturaleza química del TER y las condiciones de almacenamiento requeridas; finalmente, la viabilidad económica de producir y escalar tales combinaciones terapéuticas constituiría un obstáculo significativo, especialmente considerando los costos asociados al desarrollo regulatorio y a su implementación en contextos clínicos.

8.7.4 Limitaciones en la generalización de los resultados

Los hallazgos obtenidos no pueden extrapolarse de manera universal. En el plano clínico, la variabilidad de la respuesta sinérgica entre distintas cepas demuestra que las combinaciones TER–antibiótico no son aplicables a todos los microorganismos ni a todos los fármacos. En el plano ambiental, el estudio se centró en suelos y aguas superficiales, sin considerar otros compartimentos de importancia como sedimentos profundos, ambientes marinos, biofilms o cadenas tróficas completas. La resiliencia y recuperación de comunidades microbianas expuestas no fue evaluada a largo plazo, que serían esenciales para confirmar la seguridad ecológica de las combinaciones terapéuticas propuestas.

Capítulo 9
Futuras líneas de investigación

Capítulo 9 Futuras líneas de investigación

Los resultados de esta tesis demuestran que tanto los antibióticos sintéticos como ciertas combinaciones de ellos con productos naturales pueden generar efectos adversos en organismos no diana y alterar comunidades microbianas naturales. No obstante, la mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en exposiciones agudas bajo condiciones controladas de laboratorio. En consecuencia, la investigación del grupo va a continuar con experimentos que:

1. Evalúen efectos crónicos, subletales y multigeneracionales de antibióticos y combinaciones sobre organismos acuáticos y terrestres, considerando parámetros reproductivos, bioquímicos y genéticos.

De igual forma, son necesarias investigaciones que:

2. Analicen los procesos de bioacumulación y biomagnificación que puedan ocurrir a lo largo de las cadenas tróficas, para determinar su posible transferencia y persistencia en ecosistemas naturales.
3. Desarrollen estudios en microcosmos que simulen condiciones ambientales reales, incorporando factores físicos, químicos y bióticos que pueden modificar la toxicidad y la biodisponibilidad de los antimicrobianos.
4. Profundicen en el destino ambiental de las combinaciones TER-antibióticos, evaluando su estabilidad, productos de transformación y toxicidad relativa en comparación con sus componentes individuales.

En relación con el TER, los resultados demuestran una actividad antimicrobiana y capacidad de establecer sinergias con distintos antibióticos. Sin embargo, su eficacia individual fue inferior a la de los antimicrobianos sintéticos de referencia, lo que limita su uso como agente terapéutico único. De este modo, la investigación del equipo avanzará con nuevos ensayos orientados a:

1. Realizar investigaciones preclínicas orientadas a analizar la seguridad, eficacia, farmacocinética y posibles efectos tóxicos en líneas celulares, tejidos y modelos animales, con el fin de establecer ajustes de dosis.

Para mejorar su aplicabilidad clínica, se recomienda:

2. Explorar modificaciones estructurales y nuevas formulaciones (nanopartículas, encapsulación lipídica, conjugación química) que aumenten su capacidad

antimicrobiana y reduzcan las dosis necesarias para obtener un efecto terapéutico seguro.

3. Realizar estudios de farmacocinética y biodisponibilidad en modelos animales y humanos, evaluando su absorción, metabolismo, distribución y eliminación, así como posibles efectos adversos sistémicos.
4. Corroborar el mecanismo de acción propuesto mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en ingés), enfocándose en la visualización directa de las membranas bacterianas para evaluar posibles daños estructurales asociados con su actividad antimicrobiana.
5. Ampliar el cribado de compuestos naturales, aplicando técnicas de alto rendimiento e integrando herramientas *in silico* y de modelado molecular para identificar nuevas moléculas con actividad antimicrobiana y bajo impacto ambiental.

Por otro lado, las combinaciones TER-antibióticos mostraron efectos sinérgicos significativos en diversas cepas bacterianas, reduciendo las dosis necesarias y potencialmente limitando la aparición de resistencias. No obstante, la respuesta observada fue variable entre especies y cepas. Como siguiente paso, la investigación se enfocará en experimentos que permitan:

1. Determinen los mecanismos moleculares de la sinergia, evaluando cómo el TER interactúa con las membranas bacterianas y potencia la acción de diferentes clases de antibióticos.
2. Amplíen el estudio a un mayor número de cepas clínicas, incluidas multirresistentes, para establecer patrones de efectividad.
3. Analicen el impacto de las combinaciones sobre resistomas bacterianos y microbiotas ambientales o del huésped, con especial atención a la posible selección de genes de resistencia.

Son necesarias futuras investigaciones que:

4. Desarrollen modelos matemáticos y predictivos que permitan anticipar combinaciones más eficaces y seguras, considerando datos de toxicidad, farmacodinámica y ecología microbiana.

Finalmente, la aplicación clínica de terapias combinadas debe alinearse con estrategias globales para frenar la resistencia bacteriana y reducir el impacto ambiental de los antimicrobianos. Futuras líneas de trabajo podrían orientarse a:

1. Desarrollar estudios pre-clínicos que evalúen la seguridad, eficacia, farmacocinética y toxicidad tanto en líneas celulares, tejidos y modelos animales y que permitan ajustar dosis tras un estudio de las toxicodinámica y toxicocinética de las combinaciones.

Tras demostrar la seguridad y eficacia preclínica, el avance adecuado es:

2. Realizar estudios clínicos controlados en humanos o animales, comenzando por la fase I para determinar la seguridad y dosis idónea en pequeños grupos de voluntarios, seguido de fases II y III para confirmar su eficacia, analizar posibles efectos adversos y comparar resultados contra tratamientos convencionales en poblaciones más amplias.
3. Finalmente, la autorización y empleo terapéutico requiere cumplir los requisitos regulatorios de las agencias de medicamentos y la vigilancia continuada de seguridad y eficacia mediante estudios en práctica clínica (fase IV).
4. Diseñar evaluaciones de riesgo integradas, que consideren de manera simultánea la eficacia clínica, la toxicidad ambiental y la dinámica de resistencia de nuevos tratamientos combinados.
5. Investigar los procesos de liberación y tratamiento de residuos generados tras el uso clínico y veterinario de estas combinaciones, desarrollando métodos eficientes para su eliminación en plantas de tratamiento.
6. Elaborar guías de uso racional para compuestos naturales combinados con antibióticos, que permitan minimizar la presión selectiva y reducir la contaminación ambiental asociada al uso masivo de antimicrobianos.
7. Evaluar la viabilidad regulatoria y socioeconómica de la incorporación de este tipo de terapias combinadas, generando evidencia para sustentar su implementación en marcos normativos nacionales e internacionales.

Estas líneas de investigación futuras representan una oportunidad para avanzar hacia el desarrollo de terapias antimicrobianas más seguras, eficaces y sostenibles, integrando las dimensiones clínica, ecológica y sanitaria global. El conocimiento generado contribuirá no solo a optimizar el uso de compuestos naturales como el TER,

sino también a diseñar estrategias terapéuticas alineadas con los principios del enfoque "*One Health*", en el que la salud humana, animal y ambiental se consideran de forma conjunta e interdependiente.

Capítulo 10
Conclusiones

Capítulo 10 Conclusiones

1. Los cinco antibióticos sintéticos evaluados, de uso común en salud humana y veterinaria, mostraron ecotoxicidad aguda tanto en organismos no diana como en el crecimiento y perfil metabólico de comunidades microbianas fluviales y edáficas. Estos resultados confirman su potencial para alterar la estructura y funcionalidad de los ecosistemas acuáticos y terrestres. Su persistencia y liberación continua favorecen la exposición crónica y la aparición de resistencias.

2. El cribado de 9 productos naturales frente a 14 bacterias patógenas reveló que la HQ y, especialmente, el TER presentaron las MIC más bajas, posicionándose como los compuestos de mayor interés por su actividad antimicrobiana.

3. Entre los productos naturales estudiados, el TER mostró la mayor potencia antimicrobiana, con valores de MIC entre 0.25 y 2 mg/mL. Debido a las altas dosis necesarias para alcanzar niveles terapéuticos, su potencial se dirige a su uso en terapias combinadas

4. El análisis ecotoxicológico de TER y HQ mostró que la HQ es más tóxica, especialmente para D. magna y comunidades microbianas, lo que la descarta como candidata en sinergias. En cambio, el TER se perfila como la opción más prometedora para aplicaciones futuras

5. Aunque el TER mostró mayor toxicidad en bioindicadores individuales que los antibióticos sintéticos, su impacto en comunidades microbianas fue menor. Su biodegradabilidad, baja persistencia y limitada bioacumulación indican que en condiciones ambientales reales su ecotoxicidad sería inferior a la observada en laboratorio, con bajo riesgo de efectos prolongados

6. El estudio demostró que la condición de "producto natural" no garantiza inocuidad ambiental, como evidencia la elevada toxicidad de la HQ. Este hallazgo resalta la necesidad de aplicar evaluaciones ecotoxicológicas rigurosas incluso a compuestos de origen biogénico antes de considerar su uso terapéutico o ambiental.

7. La combinación del TER con antibióticos sintéticos generó seis sinergias destacadas frente a S. aureus (GTM y FF), S. agalactiae (GTM), A. baumannii (GTM, TC y CHL) y S. marcescens (TC y CHL), permitiendo reducir entre un 75 y 87.5% la cantidad de antibiótico necesaria para mantener la misma eficacia terapéutica. Este resultado constituye un avance significativo hacia terapias más eficientes y sostenibles.

8. El TER, especialmente en combinación con antibióticos, redujo significativamente la aparición de resistencias, probablemente gracias a su mecanismo de acción inespecífico que dificulta la adaptación bacteriana

9. Las combinaciones TER-antibióticos mostraron mayor toxicidad que los antibióticos solos en bioensayos agudos, aunque sin superar la toxicidad del antibiótico a su dosis estándar. Las mezclas con más TER fueron más tóxicas para bioindicadores, pero siempre por debajo del nivel del antibiótico en su concentración efectiva.

10. En comunidades microbianas fluviales, las combinaciones TER-antibióticos mostraron un impacto menor que los antibióticos solos, con efectos solo aditivos o antagónicos y niveles de toxicidad iguales o inferiores a los de las MIC de los antibióticos.

11. El enfoque interdisciplinar de esta investigación confirma la relevancia de integrar la dimensión ambiental en la regulación y desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas. Bajo el marco del paradigma One Health.

Finalmente; este trabajo contribuye a mostrar que, frente a la ecotoxicidad de los antibióticos sintéticos, ampliamente utilizados en salud humana y veterinaria en ecosistemas acuáticos y terrestres, el TER puede representar una opción prometedora al combinar una elevada actividad antimicrobiana con un menor impacto sobre comunidades microbianas. Aunque su eficacia en monoterapia es limitada, la combinación sinérgica de TER con antibióticos permitió reducir significativamente las dosis requeridas y la aparición de resistencias, al tiempo que mantuvo un impacto ambiental menor sobre comunidades microbianas complejas. Estos resultados evidencian el potencial del TER como coadyuvante terapéutico capaz de reforzar la eficacia antimicrobiana y favorecer la sostenibilidad ambiental, en línea con el paradigma "*One Health".*

Bibliografía

Aarestrup, F. M., H. C. Wegener & P. Collignon (2008) Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy,* 6**,** 733-750.

Abbas, R., M. Chakkour, H. Zein El Dine, E. F. Obaseki, S. T. Obeid, A. Jezzini, G. Ghssein & Z. Ezzeddine (2024) General Overview of Klebsiella pneumonia: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biology,* 13.

Abugazleh, M. K., H. M. Ali, J. A. Chester, A. M. Al-Fa'ouri & J. L. Bouldin (2023) Aquatic toxicity of hydroquinone and catechol following metal oxide treatment to Ceriodaphnia dubia and Pimephales promelas. *Ecotoxicology,* 32**,** 656-665.

AccessScience, E. (2017) U.S. bans antibiotics use for enhancing growth in livestock.

Adamczak, A., M. Ożarowski & T. M. Karpiński (2020) Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *Journal of Clinical Medicine,* 9.

Adepu, S. & S. Ramakrishna (2021) Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules,* 26.

Aelenei, P., C. M. Rimbu, E. Guguianu, G. Dimitriu, A. C. Aprotosoaie, M. Brebu, C. E. Horhogea & A. Miron (2019) Coriander essential oil and linalool – interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology,* 68**,** 156-164.

Aguirre, M., D. Abad, A. Albaina, L. Cralle, M. S. Goñi-Urriza, A. Estonba & I. Zarraonaindia (2017) Unraveling the environmental and anthropogenic drivers of bacterial community changes in the Estuary of Bilbao and its tributaries. *PLOS ONE,* 12**,** e0178755.

Agus, H. H., A. Cetin, N. Ozdemir, M. G. Ozbay, M. A. Caglar, M. A. Sariyildiz & U. Yildiz (2022) Resorcinol alleviates alpha-terpineol-induced cell death in Schizosaccharomyces pombe via increased activity of the antioxidant enzyme Sod2. *FEMS Yeast Research,* 22**,** foac052.

Ahmed, N. & K. A. Al-Mutairi (2022) Earthworms Effect on Microbial Population and Soil Fertility as Well as Their Interaction with Agriculture Practices. *Sustainability,* 14.

Aidara-Kane, A., F. J. Angulo, J. M. Conly, Y. Minato, E. K. Silbergeld, S. A. McEwen, P. J. Collignon, H. Balkhy, P. Collignon, J. Conly, C. Friedman, A. Hollis, S. Kariuki, H.-S. Kwak, S. McEwen, G. Moulin, A. Ngandjio, B. Rollin, F. Rossi, D. Wallinga & W. H. O. G. D. G. for the (2018) World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. *Antimicrobial Resistance & Infection Control,* 7**,** 7.

Akbar, S., L. Gu, Y. Sun, Q. Zhou, L. Zhang, K. Lyu, Y. Huang & Z. Yang (2020) Changes in the life history traits of Daphnia magna are associated with the gut microbiota composition shaped by diet and antibiotics. *Science of The Total Environment,* 705**,** 135827.

Akhavan, B. J., N. R. Khanna & P. Vijhani (2023) Amoxicillin.

Akhter, S., M. A. Bhat, S. Ahmed, W. A. Siddiqi, S. Ahmad & H. Shrimal (2023) Profiling of Antibiotic Residues in Surface Water of River Yamuna Stretch Passing through Delhi, India. *Water,* 15.

Alam, M., N. Bano, T. Ahmad, A. B. Sharangi, T. K. Upadhyay, Y. Alraey, N. M. Alabdallah, M. A. Rauf & M. Saeed (2022) Synergistic Role of Plant Extracts and Essential Oils against Multidrug Resistance and Gram-Negative Bacterial Strains Producing Extended-Spectrum β-Lactamases. *Antibiotics,* 11.

Alam, M.-U., S. Ferdous, A. Ercumen, A. Lin, A. Kamal, S. K. Luies, F. Sharior, R. Khan, M. Z. Rahman, S. M. Parvez, N. Amin, B. T. Tadesse, N. A. Moushomi, R. Hasan, N. Taneja, M. A. Islam & M. Rahman (2021) Effective Treatment Strategies for the Removal of Antibiotic-Resistant Bacteria, Antibiotic-Resistance Genes, and Antibiotic Residues in the Effluent From Wastewater Treatment Plants Receiving Municipal, Hospital, and Domestic Wastewater: Protocol for a Systematic Review. *JMIR Res Protoc,* 10**,** e33365.

Alaygut, D. & A. Engin (2018) Pasteurella aerogenes as an Asymptomatic Bacteriuria Agent. *Journal of Tropical Pediatrics,* 64**,** 82-84.

Albano, M., F. C. B. Alves, B. F. M. T. Andrade, L. N. Barbosa, A. F. M. Pereira, M. d. L. R. d. S. d. Cunha, V. L. M. Rall & A. Fernandes Júnior (2016) Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 38**,** 83-90.

Albesa, I., M. C. Becerra, P. C. Battán & P. L. Páez (2004) Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochemical and biophysical research communications,* 317**,** 605-609.

Alexander, P. J., L. B. Oyama, H. Olleik, F. Godoy Santos, S. O'Brien, A. Cookson, S. A. Cochrane, B. F. Gilmore, M. Maresca & S. A. Huws (2024) Microbiome-derived antimicrobial peptides show therapeutic activity against the critically important priority pathogen, Acinetobacter baumannii. *npj Biofilms and Microbiomes,* 10**,** 92.

Alharbi, S., M. Wainwright, T. Alahmadi, H. Salleeh, A. Faden & A. Chinnathambi (2014) What if Fleming had not discovered penicillin? *Saudi Journal of Biological Sciences,* 21.

Ali, S. M., R. Siddiqui & N. A. Khan (2018) Antimicrobial discovery from natural and unusual sources. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 70**,** 1287-1300.

Almuhayawi, M. S. (2020) Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 27**,** 3079-3086.

Alqahtani, A. (2023) Bacteriophage treatment as an alternative therapy for multidrug-resistant bacteria. *Saudi Medical Journal,* 44**,** 1222.

Alsallami, D., A. Alsultan, K. Hassan & S. Clarke (2023) Evaluation of efflux pump inhibitory activity of some plant extracts and using. *Open Veterinary Journal,* 13**,** 42-47.

Altawalbeh, D., T. Aburjai, Q. Balas & A. Al-Samydai (2022) In Silico and In Vitro Investigation of Anti Helicobacter Activity of Selected Phytochemicals. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences,* 14**,** 132-139.

Alves, S., D. Andreia, S. Sónia & F. C. and Domingues (2016) Study of the major essential oil compounds of Coriandrum sativum against Acinetobacter baumannii and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing. *Biofouling,* 32**,** 155-165.

Amaral, J. A., A. Ekins, S. R. Richards & R. Knowles (1998) Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology,* 64**,** 520-525.

Aminov, R. I. (2010) A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology,* 1.

An, J., G. Zuo, X. Hao, G. Wang & Z. Li (2011) Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology,* 18.

Anderson, M., D. Panteli, R. van Kessel, G. Ljungqvist, F. Colombo & E. Mossialos (2023) Challenges and opportunities for incentivising antibiotic research and development in Europe. *The Lancet Regional Health – Europe,* 33.

Andersson, D. I. (2015) Improving predictions of the risk of resistance development against new and old antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection,* 21**,** 894-898.

Andersson, D. I. & D. Hughes (2012) Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates,* 15**,** 162-172.

Andreeva, Z., D. Barton, W. J. Armour, M. Y. Li, L.-F. Liao, H. L. McKellar, K. A. Pethybridge & J. Marc (2010) Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in Arabidopsis roots. *Planta,* 232**,** 1263-1279.

Angiolella, L., G. Sacchetti & T. Efferth (2018) Antimicrobial and Antioxidant Activities of Natural Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2018**,** 1945179.

Ansola, G., P. Arroyo & L. E. Sáenz de Miera (2014) Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. *Science of The Total Environment,* 473-474**,** 63-71.

Antunes, P., C. Novais & L. Peixe (2020) Food-to-Humans Bacterial Transmission. *Microbiology Spectrum,* 8**,** 10.1128/microbiolspec.mtbp-0019-2016.

Api, A. M., D. Belsito, D. Botelho, M. Bruze, G. A. Burton, M. A. Cancellieri, H. Chon, M. L. Dagli, W. Dekant, C. Deodhar, A. D. Fryer, L. Jones, K. Joshi, M. Kumar, A. Lapczynski, M. Lavelle, I. Lee, D. C. Liebler, H. Moustakas, M. Na, T. M. Penning, G. Ritacco, J. Romine, N. Sadekar, T. W. Schultz, D. Selechnik, F. Siddiqi, I. G. Sipes, G. Sullivan, Y. Thakkar & Y. Tokura (2024) Update to RIFM fragrance ingredient safety assessment, terpineol, CAS Registry Number 8000-41-7. *Food and Chemical Toxicology,* 183**,** 114147.

Arseneault, T. & M. Filion (2017) Biocontrol through antibiosis: exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology,* 39**,** 267-274.

Aslam, B., M. Khurshid, M. I. Arshad, S. Muzammil, M. Rasool, N. Yasmeen, T. Shah, T. H. Chaudhry, M. H. Rasool, A. Shahid, X. Xueshan & Z. Baloch (2021) Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 11.

Assunção Ribeiro da Costa, R. E., C. Nunes de Melo, L. F. Reis Camboim, M. Grabowski Amorim, G. de Sousa Rodrigues, R. Brandim Marques, F. A. Martins & P. M. de Almeida (2022) Efeito citogenotóxico do α-terpineol em células meristemáticas de Allium cepa L. *Scientia Plena,* 18.

Atanasov, A. G., S. B. Zotchev, V. M. Dirsch, I. E. Orhan, et al. (2021) Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery,* 20**,** 200-216.

Awad, Y. M., S.-C. Kim, S. A. M. Abd El-Azeem, K.-H. Kim, K.-R. Kim, K. Kim, C. Jeon, S. S. Lee & Y. S. Ok (2014) Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environmental Earth Sciences,* 71**,** 1433-1440.

Ayodipupo Babalola, B., A. Ifeolu Akinwande, A. A. Otunba, G. Ebenezer Adebami, O. Babalola & C. Nwufo (2024) Therapeutic benefits of Carica papaya: A review on its pharmacological activities and characterization of papain. *Arabian Journal of Chemistry,* 17**,** 105369.

Ayukekbong, J. A., M. Ntemgwa & A. N. Atabe (2017) The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance & Infection Control,* 6**,** 47.

Backhaus, T. & L. H. Grimme (1999) The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium Vibrio fischeri. *Chemosphere,* 38**,** 3291-3301.

Badawy, M. E. I., G. I. K. Marei, E. I. Rabea & N. E. M. Taktak (2019) Antimicrobial and antioxidant activities of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against some foodborne pathogens through in vitro and in silico studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 158**,** 185-200.

Baguer, A. J., J. Jensen & P. H. Krogh (2000) Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere,* 40**,** 751-757.

Bai, Y., X. Ruan, F. Wang, G. Antoine & J. P. van der Hoek (2019) Sulfonamides removal under different redox conditions and microbial response to sulfonamides stress during riverbank filtration: A laboratory column study. *Chemosphere,* 220**,** 668-677.

Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck & M. Idaomar (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology,* 46**,** 446-475.

Balouiri, M., M. Sadiki & S. K. Ibnsouda (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis,* 6**,** 71-79.

Barbee, L., O. Soge, K. Holmes & M. Golden (2014) In vitro synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against Neisseria gonorrhoeae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy,* 69.

Baron, F., F. Nau, C. Guérin-Dubiard, S. Bonnassie, M. Gautier, S. C. Andrews & S. Jan (2016) Egg white versus Salmonella Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiology,* 53**,** 82-93.

Bastos, M. C., M. Soubrand, T. Le Guet, É. Le Floch, E. Joussein, M. Baudu & M. Casellas (2020) Occurrence, fate and environmental risk assessment of pharmaceutical compounds in soils amended with organic wastes. *Geoderma,* 375**,** 114498.

Battin, T., L. Kaplan, S. Findlay, C. Hopkinson, E. Martí, A. Packman, D. Newbold & F. Sabater (2009) Biophysical controls on organic carbon fluxes in fluvial networks. *Nature Geoscience,* 1**,** 95-100.

Battistuzzi, F. U. & S. B. Hedges (2009) A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Molecular Biology and Evolution,* 26**,** 335-343.

Beale, D. J., A. V. Karpe, W. Ahmed, S. Cook, P. D. Morrison, C. Staley, M. J. Sadowsky & E. A. Palombo (2017) A Community Multi-Omics Approach towards the Assessment of Surface Water Quality in an Urban River System. *International Journal of Environmental Research and Public Health,* 14.

Belenky, P., Jonathan D. Ye, Caroline B. M. Porter, Nadia R. Cohen, Michael A. Lobritz, T. Ferrante, S. Jain, Benjamin J. Korry, Eric G. Schwarz, Graham C. Walker & James J. Collins (2015) Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage. *Cell Reports,* 13**,** 968-980.

Bello-López, J. M., O. A. Cabrero-Martínez, G. Ibáñez-Cervantes, C. Hernández-Cortez, L. I. Pelcastre-Rodríguez, L. U. Gonzalez-Avila & G. Castro-Escarpulli (2019) Horizontal Gene Transfer and Its Association with Antibiotic Resistance in the Genus Aeromonas spp. *Microorganisms,* 7.

Benassi-Borba, L., C. M. P. Dal'Lin, R. C. Testolin, N. M. Batista Vieira, C. V. Tagliari Corrêa, I. Bianchi, M. J. Batista Barwinski, C. M. Radetski & C. A. Somensi (2021) Assessment of phytotoxicity and impact on the enzymatic activity of soil microorganisms caused by veterinary antibiotics used in Brazilian farms. *Journal of Environmental Science and Health, Part B,* 56**,** 675-684.

Bengoechea, J. A. & J. Sa Pessoa (2019) Klebsiella pneumoniae infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews,* 43**,** 123-144.

Bengtsson, B. & C. Greko (2014) Antibiotic resistance—consequences for animal health, welfare, and food production. *Upsala Journal of Medical Sciences,* 119**,** 96–102.

Benhadid, R., Y. Hadef, A. Djahoudi & K. Hosni (2022) Chemical characterization, evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of Algerian (Myrtus communis L). *Progress in Nutrition,* 24**,** e2022029.

Ben Akacha, B., M. Michalak, I. Generalić Mekinić, M. Kačániová, M. Chaari, F. Brini, R. Ben Saad, W. Mnif, S. Garzoli & A. Ben Hsouna (2024) Mixture design of α-pinene, α-terpineol, and 1,8-cineole: A multiobjective response followed by

chemometric approaches to optimize the antibacterial effect against various bacteria and antioxidant activity. *Food Science & Nutrition,* 12**,** 574-589.

Bernier, S. P. & M. G. Surette (2013) Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Frontiers in Microbiology,* 4.

Beutler, J. A. (2019) Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Current Protocols in Pharmacology,* 86**,** e67.

Bhatia, S. P., C. S. Letizia & A. M. Api (2008) Fragrance material review on alpha-terpineol. *Food and Chemical Toxicology,* 46**,** S280-S285.

Bhattamisra, S. K., C. H. Kuean, L. B. Chieh, V. L. Y. Yan, C. K. Lee, L. P. Hooi, L. P. Shyan, Y. K. Liew, M. Candasamy & P. S. Sahu (2018) Antibacterial Activity of Geraniol in Combination with Standard Antibiotics against Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Helicobacter pylori. *Natural Product Communications,* 13**,** 1934578X1801300701.

Blain, N. P., B. L. Helgason & J. J. Germida (2017) Endophytic root bacteria associated with the natural vegetation growing at the hydrocarbon-contaminated Bitumount Provincial Historic site. *Canadian Journal of Microbiology,* 63**,** 502-515.

Bloor, M. C., A. Kiryushina, K. Kydralieva, L. Bondarenko, L. Pozdnyakov, N. Manucharova & V. Terekhova (2021) Divergent Effects of Antibiotics on Plants and Microbiota in Soils with Contrasting Humus Content. *Water, Air, & Soil Pollution,* 232**,** 518.

Bontempo, P., L. De Masi & D. Rigano (2023) Functional Properties of Natural Products and Human Health. *Nutrients,* 15.

Bouknana, D., S. Jodeh, M. Sbaa, B. Hammouti, M. Arabi, A. Darmous, M. Slamini & K. Haboubi (2019) A phytotoxic impact of phenolic compounds in olive oil mill wastewater on fenugreek "Trigonella foenum-graecum". *Environmental Monitoring and Assessment,* 191**,** 405.

Boxall, A. B. A., P. Johnson, E. J. Smith, C. J. Sinclair, E. Stutt & L. S. Levy (2006) Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54**,** 2288-2297.

Bremner, J. M. & H. S. Chai (1989) Effects of phosphoroamides on ammonia volatilization and nitrite accumulation in soils treated with urea. *Biology and Fertility of Soils,* 8**,** 227-230.

Brosche, S. & T. Backhaus (2010) Toxicity of five protein synthesis inhibiting antibiotics and their mixture to limnic bacterial communities. *Aquatic Toxicology,* 99**,** 457-465.

Brouwers, R., H. Vass, A. Dawson, T. Squires, S. Tavaddod & R. J. Allen (2020) Stability of β-lactam antibiotics in bacterial growth media. *PLOS ONE,* 15**,** e0236198.

Browne, A. J., M. G. Chipeta, G. Haines-Woodhouse, E. P. A. Kumaran, B. H. K. Hamadani, S. Zaraa, N. J. Henry, A. Deshpande, R. C. Reiner, Jr., N. P. J. Day, A. D. Lopez, S. Dunachie, C. E. Moore, A. Stergachis, S. I. Hay & C. Dolecek

(2021) Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health,* 5**,** e893-e904.

Bubrick, M., R. Howard, S. Pancorbo, R. Lorber, T. Chin & R. Yost (1983) A comparative study of netilmicin-cefoxitin and gentamicin-cefoxitin in surgical patients with serious systemic infection. *Clinical therapeutics,* 5.

Burki, T. K. (2018) Superbugs: An Arms Race Against Bacteria. *The Lancet Respiratory Medicine,* 6**,** 668.

Burns, J. & A. Smith (1987) A major outer-membrane protein functions as a porin in Haemophilus influenzae. *Journal of general microbiology,* 133.

Butaye, P., A. Devriese Luc & F. Haesebrouck (2003) Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews,* 16**,** 175-188.

Bártíková, H., L. Skálová, L. Stuchlíková, I. Vokřál, T. Vaněk & R. Podlipná (2015) Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug metabolism reviews,* 47**,** 374-387.

Böger, B., M. Surek, R. d. O. Vilhena, M. M. Fachi, A. M. Junkert, J. M. M. F. Santos, E. L. Domingos, A. d. F. Cobre, D. R. Momade & R. Pontarolo (2021) Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. *Journal of Hazardous Materials,* 402**,** 123448.

Cai, J., H. Wen, H. Zhou, D. Zhang, D. Lan, S. Liu, C. Li, X. Dai, T. Song, X. Wang, Y. He, Z. He, J. Tan & J. Zhang (2023) Naringenin: A flavanone with anti-inflammatory and anti-infective properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 164**,** 114990.

Cakir-Koc, R. & B. Özdemir. 2018. Chapter 15 - A Global Problem of Toxoplasmosis. In *The Microbiology of Central Nervous System Infections,* eds. K. Kon & M. Rai, 305-317. Academic Press.

Calleja, M. C., G. Persoone & P. Geladi (1994) Comparative acute toxicity of the first 50 Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology,* 26**,** 69-78.

Calza, P., C. Massolino & E. Pelizzetti (2008) Photo-induced transformation of hexaconazole and dimethomorph over TiO2 suspension. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry,* 200**,** 356-363.

Camilo-Cotrim, C. F., E. F. L. C. Bailão, L. S. Ondei, F. M. Carneiro & L. M. Almeida (2022) What can the Allium cepa test say about pesticide safety? A review. *Environmental Science and Pollution Research,* 29**,** 48088-48104.

Candido, N. R., L. V. Modolo, V. M. D. Pasa & A. de Fatima (2023) Pyroligneous acids of coconut shell, black wattle and eucalyptus: physical-chemical characterization and in vitro evaluation as potential urease inhibitors. *Quim. Nova,* 46**,** 961-971.

Caneschi, A., A. Bardhi, A. Barbarossa & A. Zaghini (2023) The Use of Antibiotics and Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine, a Complex Phenomenon: A Narrative Review. *Antibiotics,* 12.

Cao, J., D. Ji & C. Wang (2015) Interaction between earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on the degradation of oxytetracycline in soils. *Soil Biology and Biochemistry,* 90**,** 283-292.

Carlotti, B., A. Cesaretti & F. Elisei (2012) Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques. *Physical Chemistry Chemical Physics,* 14**,** 823-834.

Carraschi, S., N. Shiogiri, F. Venturini, C. Cruz, A. C. F. Gírio & J. Machado-Neto (2011) Acute toxicity and environmental risk of oxytetracyline and florfenicol antibiotics to pacu (Piaractus mesopotamicus). *Boletim do Instituto de Pesca,* 37**,** 115-122.

Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin & I. Phillips (2003) The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 52**,** 159-161.

Castrejón-Godínez, M. L., E. Tovar-Sánchez, M. L. Ortiz-Hernández, S. Encarnación-Guevara, A. G. Martínez-Batallar, M. Hernández-Ortiz, E. Sánchez-Salinas, A. Rodríguez & P. Mussali-Galante (2022) Proteomic analysis of Burkholderia zhejiangensis CEIB S4–3 during the methyl parathion degradation process. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 187**,** 105197.

Cedergreen, N., A. Kamper & J. C. Streibig (2006) Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquatic Toxicology,* 78**,** 243-252.

Chacón, L., L. Reyes, L. Rivera-Montero & K. Barrantes. 2022. Chapter 5 - Transport, fate, and bioavailability of emerging pollutants in soil, sediment, and wastewater treatment plants: potential environmental impacts. In *Emerging Contaminants in the Environment,* eds. H. Sarma, D. C. Dominguez & W.-Y. Lee, 111-136. Elsevier.

Chacón, O. & B. Martíno (2019) Effect of Aloe barbadensis Miller (Aloe vera) associated with beta-lactam antibiotics on the occurrence of resistance in strains of Staphylococcus aureus and Streptococcus uberis. *European Journal of Integrative Medicine,* 32**,** 100996.

Chadha, J., Ravi, J. Singh & K. Harjai (2022) α-Terpineol synergizes with gentamicin to rescue Caenorhabditis elegans from Pseudomonas aeruginosa infection by attenuating quorum sensing-regulated virulence. *Life Sciences,* 313**,** 121267.

Chakkour, M., Z. Hammoud, S. Farhat, A. El Roz, Z. Ezzeddine & G. Ghssein (2024) Overview of Proteus mirabilis pathogenicity and virulence. Insights into the role of metals. *Frontiers in Microbiology,* Volume 15 - 2024.

Chambers, H. F. (1999) Penicillin-Binding Protein-Mediated Resistance in Pneumococci and Staphylococci. *The Journal of Infectious Diseases,* 179**,** S353-S359.

Chan, R., S. Wandee, M. Wang, W. Chiemchaisri, C. Chiemchaisri & C. Yoshimura (2020) Fate, transport and ecological risk of antibiotics from pig farms along the bang pakong River, Thailand. *Agriculture, Ecosystems & Environment,* 304**,** 107123.

Charani, E., M. Mendelson, S. J. C. Pallett, R. Ahmad, M. Mpundu, O. Mbamalu, C. Bonaconsa, V. Nampoothiri, S. Singh, N. Peiffer-Smadja, V. Anton-Vazquez, L. S. P. Moore, J. Schouten, T. Kostyanev, V. Vlahović-Palčevski, D. Kofteridis, J. S. Corrêa & A. H. Holmes (2023) An analysis of existing national action plans for antimicrobial resistance—gaps and opportunities in strategies optimising antibiotic use in human populations. *The Lancet Global Health,* 11**,** e466-e474.

Charlesworth, C. T., P. S. Deshpande, D. P. Dever, J. Camarena, V. T. Lemgart, M. K. Cromer, C. A. Vakulskas, M. A. Collingwood, L. Zhang, N. M. Bode, M. A. Behlke, B. Dejene, B. Cieniewicz, R. Romano, B. J. Lesch, N. Gomez-Ospina, S. Mantri, M. Pavel-Dinu, K. I. Weinberg & M. H. Porteus (2019) Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature Medicine,* 25**,** 249-254.

Chaves, B. J. & P. Tadi (2023) Gentamicin.

Chen, C., Y. Chen, P. Wu & B. Chen (2014) Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. *Journal of the Formosan Medical Association,* 113**,** 72-82.

Chen, H., J. Yao, F. Wang, M. M. F. Choi, E. Bramanti & G. Zaray (2009) Study on the toxic effects of diphenol compounds on soil microbial activity by a combination of methods. *Journal of Hazardous Materials,* 167**,** 846-851.

Chen, J., B. Zhu & Y. Zhang (2023) A meta-analysis on the responses of soil microbial biomass and community structure to antibiotics. *Applied Soil Ecology,* 184**,** 104786.

Chen, X., X. Hu, Q. Lu, Y. Yang, S. Linghu & X. Zhang (2022) Study on the differences in sludge toxicity and microbial community structure caused by catechol, resorcinol and hydroquinone with metagenomic analysis. *Journal of Environmental Management,* 302**,** 114027.

Chen, Z., J. Wang, K. Wang, F. An, S. Liu, H. Yan & Y. Hua (2025) Multidrug-resistant Proteus mirabilis in a critically endangered Malayan pangolin: clinical and genomic insights. *Frontiers in Veterinary Science,* Volume 12 - 2025.

Cheng, H. & X. An (2025) Frontiers | Cold stimuli, hot topic: An updated review on the biological activity of menthol in relation to inflammation.

Cheow, W. S. & K. Hadinoto (2010) Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 370**,** 79-86.

Chien, S. H., L. I. Prochnow & a. H. Cantarella (2009) Recent developments of fertilizer production and use to improve nutrient efficiency and minimize environmental impacts. *Advances in agronomy,* 102**,** 267-322.

Choi, K., Y. Kim, J. Jung, M. H. Kim, C. S. Kim, N. H. Kim & J. Park (2008) Occurrences and ecological risks of roxithromycin, trimethoprim, and chloramphenicol in the Han River, Korea. *Environmental Toxicology and Chemistry,* 27**,** 711-719.

Choi, S., W. Sim, D. Jang, Y. Yoon, J. Ryu, J. Oh, J.-S. Woo, Y. M. Kim & Y. Lee (2020) Antibiotics in coastal aquaculture waters: Occurrence and elimination efficiency in oxidative water treatment processes. *Journal of Hazardous Materials,* 396**,** 122585.

Chopra, I. & M. Roberts (2025) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 65**,** 232.

Chouhan, S., K. Sharma & S. Guleria (2017) Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines,* 4.

Christensen, A. M., F. Ingerslev & A. Baun (2006) Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry,* 25**,** 2208-2215.

Chroňáková, A., M. Kyselková & D. Elhottová (2021) Common and management-specific responses of grassland soil bacterial communities to manure and chlortetracycline amendments. *European Journal of Soil Biology,* 105**,** 103320.

Clark, C., K. Kosowska-Shick, P. McGhee, B. Dewasse, L. Beachel & C. Appelbaum Peter (2009) Resistance Selection Studies Comparing the Activity of Razupenem (PTZ601) to Vancomycin and Linezolid against Eight Methicillin-Resistant and Two Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 53**,** 3118-3121.

Cláudio Ernesto Taveira, P., S. Jordi & M. Esther (2018) Ecotoxicity and Biodegradability of Oxytetracycline and Ciprofloxacin on Terrestrial and Aquatic Media. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry,* 10.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.

Coates, A., Y. Hu, R. Bax & C. Page (2002) The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery,* 1**,** 895-910.

Coats, J. R., L. L. Karr & C. D. Drewes. 1991. Toxicity and Neurotoxic Effects of Monoterpenoids. In *Naturally Occurring Pest Bioregulators*, 305-316. American Chemical Society.

Collignon, P., H. Wegener, P. Braam & C. Butler (2005) The Routine Use of Antibiotics to Promote Animal Growth Does Little to Benefit Protein Undernutrition in the Developing World. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America,* 41**,** 1007-13.

Colomer-Lluch, M., J. Jofre & M. Muniesa (2011) Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLOS ONE,* 6**,** e17549.

Commission Implementing Decision (EU). 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant

to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 (notified under document C(2018) 3362). Official Journal of the European Union. L 141/9. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32018D0840 (accessed on 17 January 2024).

Conde-Cid, M., A. Núñez-Delgado, M. J. Fernández-Sanjurjo, E. Álvarez-Rodríguez, D. Fernández-Calviño & M. Arias-Estévez (2020) Tetracycline and Sulfonamide Antibiotics in Soils: Presence, Fate and Environmental Risks. *Processes,* 8.

Cornejo, J., K. Yevenes, C. Avello, E. Pokrant, A. Maddaleno, B. S. Martin & L. Lapierre (2018) Determination of Chlortetracycline Residues, Antimicrobial Activity and Presence of Resistance Genes in Droppings of Experimentally Treated Broiler Chickens. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry,* 23**,** 1264.

Cossins, A. R. & C. L. Prosser (1978) Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 75**,** 2040-2043.

Costa, S. S., C. Ferreira, R. Ribeiro, A. T. Feßler, A.-K. Schink, K. Kadlec, H. Kaspar, A. Amaro, T. Albuquerque, P. Abrantes, C. Morais, C. Pomba, S. Schwarz & I. Couto (2021) Proposal of Epidemiological Cutoff Values for Apramycin 15 µg and Florfenicol 30 µg Disks Applicable to Staphylococcus aureus. *Microbial Drug Resistance,* 27**,** 1555-1559.

Crass, R. & M. Pai (2019) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of β-Lactamase Inhibitors. *Pharmacotherapy,* 39.

Crisinei, A., L. Delaunay, D. Rossel, J. Tarradellas, H. Meyer, H. Saïah, P. Vogel, C. Delisle & C. Blaise (1994) Cyst-based ecotoxicological tests using Anostracans: Comparison of two species of Streptocephalus. *Environmental Toxicology and Water Quality,* 9**,** 317-326.

Cristina, R. T., M. Baroga, E. Dumitrescu, F. Muselin, A. O. Doma, D. Manea & I. Banatean-Dunea (2022) Use of Eisenia fetida as a Biological Risk Marker in a Qualitative Eco Assessment Test of a Romanian Watercourse. *Biology,* 11.

Cuaron, J. A., S. Dulal, Y. Song, A. K. Singh, C. E. Montelongo, W. Yu, V. Nagarajan, R. K. Jayaswal, B. J. Wilkinson & J. E. Gustafson (2013) Tea Tree Oil-Induced Transcriptional Alterations in Staphylococcus aureus. *Phytotherapy Research,* 27**,** 390-396.

Curbelo, F., A. Garnica, B. Nascimento, G. Laís Rodrigues Leal, T. Tertuliano & R. Ribeiro da Silva (2021) Influence of the oleic phase and co-surfactant addition in non-ionic microemulsified systems. *Research, Society and Development,* 10**,** e58410212902.

Cushnie, T. P. T. & A. J. Lamb (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 38**,** 99-107.

Cycoń, M., A. Mrozik & Z. Piotrowska-Seget (2019) Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Frontiers in Microbiology,* 10.

Czech, B., I. Jośko & P. Oleszczuk (2014) Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to Vibrio fischeri and Daphnia magna before and after photooxidation process. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 104**,** 247-253.

Céliz, G., M. Daz & M. Audisio (2011) Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *Journal of applied microbiology,* 111.

da Nóbrega Alves, D., A. F. Monteiro, P. N. Andrade, J. G. Lazarini, G. M. Abílio, F. Q. Guerra, M. T. Scotti, L. Scotti, P. L. Rosalen & R. D. Castro (2020) Docking Prediction, Antifungal Activity, Anti-Biofilm Effects on Candida spp., and Toxicity against Human Cells of Cinnamaldehyde. *Molecules,* 25.

Dache, A., A. Dona & A. Ejeso (2021) Inappropriate use of antibiotics, its reasons and contributing factors among communities of Yirgalem town, Sidama regional state, Ethiopia: A cross-sectional study. *SAGE Open Medicine,* 9**,** 20503121211042461.

Dadgostar, P. (2019) Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance,* 12**,** 3903.

Das, M. C., P. Sandhu, P. Gupta, P. Rudrapaul, U. C. De, P. Tribedi, Y. Akhter & S. Bhattacharjee (2016) Attenuation of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. *Scientific Reports,* 6**,** 23347.

Dassanayake, M. K., T.-J. Khoo & J. An (2021) Antibiotic resistance modifying ability of phytoextracts in anthrax biological agent Bacillus anthracis and emerging superbugs: a review of synergistic mechanisms. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,* 20**,** 79.

Davies, J. (1979) Aminoglycoside-modifying enzymes. *International journal of clinical pharmacology and biopharmacy,* 17.

de Bruin, S., J. Dengerink & J. van Vliet (2021) Urbanisation as driver of food system transformation and opportunities for rural livelihoods. *Food Security,* 13**,** 781-798.

de Ilurdoz, M. S., J. J. Sadhwani & J. V. Reboso (2022) Antibiotic removal processes from water & wastewater for the protection of the aquatic environment - a review. *Journal of Water Process Engineering,* 45**,** 102474.

de Mattos-Shipley, K. M. J., G. D. Foster & A. M. Bailey (2017) Insights into the Classical Genetics of Clitopilus passeckerianus – the Pleuromutilin Producing Mushroom. *Frontiers in Microbiology,* 8.

Deisinger, P., T. Hill & J. English (1996) Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *Journal of toxicology and environmental health,* 47.

Dias, K. J. S. D. O., G. M. Miranda, J. R. Bessa, A. C. J. D. Araújo, P. R. Freitas, R. S. D. Almeida, C. L. R. Paulo, J. B. D. A. Neto, H. D. M. Coutinho & J. Ribeiro-Filho

(2022) Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology,* 13.

Ding, C. & J. He (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 87**,** 925-941.

Ding, G.-C., V. Radl, B. Schloter-Hai, S. Jechalke, H. Heuer, K. Smalla & M. Schloter (2014) Dynamics of Soil Bacterial Communities in Response to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine. *PLOS ONE,* 9**,** e92958.

Doi, Y. & H. F. Chambers. 2015. 20 - Penicillins and β-Lactamase Inhibitors. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition),* eds. J. E. Bennett, R. Dolin & M. J. Blaser, 263-277.e3. Philadelphia: W.B. Saunders.

Domán, M., L. Makrai, B. Vásárhelyi, G. Balka & K. Bányai (2023) Molecular epidemiology of Candida albicans infections revealed dominant genotypes in waterfowls diagnosed with esophageal mycosis. *Frontiers in Veterinary Science,* Volume 10 - 2023.

Dong, D., Y. Kou, W. Yang, G. Chen & H. Xu (2018) Effects of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions and nitrifying/denitrifying microbial communities in a rainfed maize soil: A 6-year field observation. *Soil and Tillage Research,* 180**,** 82-90.

Dong, J., J. Qiu, J. Wang, H. Li, X. Dai, Y. Zhang, X. Wang, W. Tan, N. Xiaodi, X. Deng & S. Zhao (2012a) Apigenin alleviates the symptoms of Staphylococcus aureus pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. *FEMS microbiology letters,* 338.

Dong, L., J. Gao, X. Xie & Q. Zhou (2012b) DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm Eisenia fetida. *Chemosphere,* 89**,** 44-51.

DrugBank Online (2025a). Menthol. Retrieved January 20, 2025 from https://go.drugbank.com/drugs/DB00825.

DrugBank Online (2025b). Terpineol. Retrieved January 20, 2025 from https://go.drugbank.com/drugs/DB15956.

DrugBank Online (2025c). Cloramphenicol. Retrieved January 20, 2025 from https://go.drugbank.com/drugs/DB00446.

DrugBank Online (202d). Streptomycin. Retrieved January 20, 2025 from https://go.drugbank.com/drugs/DB01082.

DrugBank Online (2025e). Gentamicin. Retrieved January 20, 2025 from https://go.drugbank.com/drugs/DB00798.

DrugBank Online (2025f). Oxytetracycline. Retrieved January 20, 2025 from https://go.drugbank.com/drugs/DB00595.

Dumancas, G. G., R. S. Hikkaduwa Koralege, E. R. E. Mojica, B. S. Murdianti & P. J. Pham. 2014. Penicillins. In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition),* ed. P. Wexler, 768-772. Oxford: Academic Press.

Duran, R., A. Bielen, T. Paradžik, C. Gassie, E. Pustijanac, C. Cagnon, B. Hamer & D. Vujaklija (2015) Exploring Actinobacteria assemblages in coastal marine sediments under contrasted Human influences in the West Istria Sea, Croatia. *Environmental Science and Pollution Research,* 22**,** 15215-15229.

Durand, G. A., D. Raoult & G. Dubourg (2019) Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 53**,** 371-382.

Duscher, A. A., A. Conesa, M. Bishop, M. M. Vroom, S. D. Zubizarreta & J. S. Foster (2018) Transcriptional profiling of the mutualistic bacterium Vibrio fischeri and an hfq mutant under modeled microgravity. *npj Microgravity,* 4**,** 25.

Ebbers, M., C. J. Hemmer, B. Müller-Hilke & E. C. Reisinger (2021) Immunotherapy and vaccination against infectious diseases. *Wiener klinische Wochenschrift,* 133**,** 714-720.

El Zowalaty, M. E., B. Lamichhane, L. Falgenhauer, S. Mowlaboccus, O. T. Zishiri, S. Forsythe & Y. A. Helmy (2023) Antimicrobial resistance and whole genome sequencing of novel sequence types of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, and Enterococcus durans isolated from livestock. *Scientific Reports,* 13**,** 18609.

El-Ghenymy, A., R. M. Rodríguez, E. Brillas, N. Oturan & M. A. Oturan (2014) Electro-Fenton degradation of the antibiotic sulfanilamide with Pt/carbon-felt and BDD/carbon-felt cells. Kinetics, reaction intermediates, and toxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research,* 21**,** 8368-8378.

Eladl, A., R. Attia, H. Abdullatif & A. El-Ganiny (2024) The Effect of Combinations of Antibiotics and Natural Products on the Antimicrobial Resistance of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *The Open Infectious Diseases Journal,* 16.

Embley, T. & E. Stackebrandt (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual review of microbiology,* 48.

Erdoğan Eliuz, E. A. (2021) Antimicrobial Activity and Mechanism of Essential Oil of Endemic Salvia hypargeia Finc. & Mey. in Turkey. *Indian Journal of Microbiology,* 61**,** 291-297.

Eshboev, F., N. Mamadalieva, P. A. Nazarov, H. Hussain, V. Katanaev, D. Egamberdieva & S. Azimova (2024) Antimicrobial Action Mechanisms of Natural Compounds Isolated from Endophytic Microorganisms. *Antibiotics,* 13.

Esquenazi, E., A. C. Jones, T. Byrum, P. C. Dorrestein & W. H. Gerwick (2011) Temporal dynamics of natural product biosynthesis in marine cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 108**,** 5226-5231.

Essack, S. (2021) Water, sanitation and hygiene in national action plans for antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization,* 99**,** 606.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious, D. (2000) Terminology relating to methods

for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical microbiology and infection,* 6**,** 503-508.

Fabian, I., E. Sinnathamby, C. Flanagan, A. Lindberg & B. Tynes (2025) Topical Hydroquinone for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus,* 15.

Fang, H., Y. L. Han, Y. M. Yin, X. X. Jin, S. Y. Wang, F. F. Tang, L. Cai & Y. L. Yu (2014a) Microbial response to repeated treatments of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline in soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B,* 49**,** 609-615.

Fang, H., T. Zhou, X. Chen, S. Li, G. Shen & X. Liao (2014b) Controlled preparation and characterization of nano-sized hexagonal Mg(OH)2 flame retardant. *Particuology,* 14**,** 51-56.

Fang, L., P. Lakshmanan, X. Su, Y. Shi, Z. Chen, Y. Zhang, W. Sun, J. Wu, R. Xiao & X. Chen (2025) Impact of residual antibiotics on microbial decomposition of livestock manures in Eutric Regosol: Implications for sustainable nutrient recycling and soil carbon sequestration. *Journal of Environmental Sciences,* 147**,** 498-511.

Farrell David, J., M. Robbins, W. Rhys-Williams & G. Love William (2011) Investigation of the Potential for Mutational Resistance to XF-73, Retapamulin, Mupirocin, Fusidic Acid, Daptomycin, and Vancomycin in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates during a 55-Passage Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 55**,** 1177-1181.

Farzam, K., T. A. Nessel & J. Quick (2023) Erythromycin.

Fda, U. S., 2011. Synthetic Flavoring Substances and Adjuvants. 21 CFR 182.

Feng, G., T. Xie, X. Wang, J. Bai, L. Tang, H. Zhao, W. Wei, M. Wang & Y. Zhao (2018) Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil. *BMC Microbiology,* 18**,** 11.

Fernanda, J.-R. M., C. Héctor, O. A. F. & S. M. Evelyn (2019) Natural compounds: A sustainable alternative to the phytopathogens control. *Journal of the Chilean Chemical Society (Boletín de la Sociedad Chilena de Química), ISSN-e 0717-6309, ISSN 0366-1644, Vol. 64, Nº. 2, 2019, págs. 4459-4465*.

Fernandez, R., N. R. Colás-Ruiz, H. J. Bolívar-Anillo, G. Anfuso & M. Hampel (2021) Occurrence and Effects of Antimicrobials Drugs in Aquatic Ecosystems. *Sustainability,* 13.

Ferraboschi, P., S. Ciceri & P. Grisenti (2025) Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics,* 10**,** 1534.

Ferrando, N., M. R. Pino-Otín, E. Terrado, D. Ballestero & E. Langa (2024) Bioactivity of Eugenol: A Potential Antibiotic Adjuvant with Minimal Ecotoxicological Impact. *International Journal of Molecular Sciences,* 25.

Ferraz, M. P. (2024) Antimicrobial Resistance: The Impact from and on Society According to One Health Approach. *Societies,* 14.

Fink, R. (2023) Terpenoids as Natural Agents against Food-Borne Bacteria—Evaluation of Biofilm Biomass versus Viability Reduction. *Processes,* 11**,** 148.

Fiskesjö, G. (1993) The allium test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality,* 8**,** 291-298.

Fleming, A. (1929) "On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ." *British journal of experimental pathology,* 10, 226–236.

Flood Jake, J. & D. Copley Shelley (2018) Genome-Wide Analysis of Transcriptional Changes and Genes That Contribute to Fitness during Degradation of the Anthropogenic Pollutant Pentachlorophenol by Sphingobium chlorophenolicum. *mSystems,* 3**,** 10.1128/msystems.00275-18.

Founou, L. L., R. C. Founou & S. Y. Essack (2016) Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology,* 7.

Freire, A. R., D. E. W. G. Freire, S. A. d. Sousa, E. M. Serpa, L. d. F. D. d. Almeida & Y. W. Cavalcanti (2021) Antibacterial and Solubility Analysis of Experimental Phytotherapeutic Paste for Endodontic Treatment of Primary Teeth. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada,* 21.

Friman, M. J., M. H. Eklund, A. H. Pitkälä, P. J. Rajala-Schultz & M. H. J. Rantala (2019) Description of two Serratia marcescens associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica,* 61**,** 54.

Fàbrega, A. & J. Vila (2013) Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology Reviews,* 26**,** 308-341.

Gan, C., E. Langa, D. Ballestero & M. R. Pino-Otín (2024) Comparative ecotoxicity assessment of highly bioactive isomeric monoterpenes carvacrol and thymol on aquatic and edaphic indicators and communities. *Chemosphere,* 368**,** 143666.

Gan, C., E. Langa, A. Valenzuela, D. Ballestero & M. R. Pino-Otín (2023) Synergistic Activity of Thymol with Commercial Antibiotics against Critical and High WHO Priority Pathogenic Bacteria. *Plants,* 12**,** 1868.

Gao, F., Z. Li, Q. Chang, M. Gao, Z. She, J. Wu, C. Jin, D. Zheng, L. Guo, Y. Zhao & S. Wang (2018) Effect of florfenicol on performance and microbial community of a sequencing batch biofilm reactor treating mariculture wastewater. *Environmental Technology,* 39**,** 363-372.

Gao, M., M. Lv, M. Han, W. Song & D. Wang (2016) Avoidance behavior of Eisenia fetida in oxytetracycline- and heavy metal-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 47**,** 119-123.

Gao, M., Y. Qi, W. Song & Q. Zhou (2015) Biomarker analysis of combined oxytetracycline and zinc pollution in earthworms (Eisenia fetida). *Chemosphere,* 139**,** 229-234.

García-Rey, C. (2010) El papel de la industria farmacéutica. ¿Por qué no se comercializan nuevos antibióticos? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica,* 28**,** 45-49.

Garland Jay, L. & L. Mills Aaron (1991) Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology,* 57**,** 2351-2359.

Ge, S., W. Tian, Z. Lou, X. Wang, L.-L. Zhuang & J. Zhang (2024) Long-term toxicity assessment of antibiotics against Vibrio fischeri: Test method optimization and mixture toxicity prediction. *Journal of Hazardous Materials,* 469**,** 133933.

Gelpi, A., A. Gilbertson & J. D. Tucker (2015) Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology. *Sexually transmitted infections,* 91**,** 68-69.

Genuário, D. B., M. G. M. V. Vaz & I. S. d. Melo (2017) Phylogenetic insights into the diversity of homocytous cyanobacteria from Amazonian rivers. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 116**,** 120-135.

Georgakakos, C. B., C. E. Martínez, D. E. Helbling & M. T. Walter (2023) More movement with manure: increased mobility of erythromycin through agricultural soil in the presence of manure. *Journal of Water and Health,* 21**,** 1143-1157.

Gerba, C. P. 2015. Chapter 22 - Environmentally Transmitted Pathogens. In *Environmental Microbiology (Third Edition),* eds. I. L. Pepper, C. P. Gerba & T. J. Gentry, 509-550. San Diego: Academic Press.

Ghosh, M., P. Dey, A. Das, A. Giri, S. Nath & S. Giri (2024) Evaluation of arsenic induced genotoxicity and its impact on life processes of Daphnia magna. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 899**,** 503804.

Gomes, M. P. (2024) The Convergence of Antibiotic Contamination, Resistance, and Climate Dynamics in Freshwater Ecosystems. *Water,* 16.

Gomez, J. E., B. B. Kaufmann-Malaga, C. N. Wivagg, P. B. Kim, M. R. Silvis, N. Renedo, T. R. Ioerger, R. Ahmad, J. Livny, S. Fishbein, J. C. Sacchettini, S. A. Carr & D. T. Hung (2017) Ribosomal mutations promote the evolution of antibiotic resistance in a multidrug environment. *eLife,* 6**,** e20420.

Gonzalez-Pastor, R., S. E. Carrera-Pacheco, J. Zúñiga-Miranda, C. Rodríguez-Pólit, A. Mayorga-Ramos, L. P. Guamán & C. Barba-Ostria (2023) Current Landscape of Methods to Evaluate Antimicrobial Activity of Natural Extracts. *Molecules,* 28.

González-Montalvo, M. A., J. M. Sorescu, G. Baltes, O. Juárez & K. Tuz (2024) The respiratory chain of Klebsiella aerogenes in urine-like conditions: critical roles of NDH-2 and bd-terminal oxidases. *Frontiers in Microbiology,* Volume 15 - 2024.

González-Pleiter, M., S. Gonzalo, I. Rodea-Palomares, F. Leganés, R. Rosal, K. Boltes, E. Marco & F. Fernández-Piñas (2013) Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research,* 47**,** 2050-2064.

Goulas, A., B. Livoreil, N. Grall, P. Benoit, C. Couderc-Obert, C. Dagot, D. Patureau, F. Petit, C. Laouénan & A. Andremont (2018) What are the effective solutions to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review protocol. *Environmental Evidence,* 7**,** 3.

Gould, K. (2016) Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 71**,** 572-575.

Grenni, P., V. Ancona & A. Barra Caracciolo (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal,* 136**,** 25-39.

Grosset, J. H. & T. Singer. 2013. Streptomycin. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition),* eds. S. Maloy & K. Hughes, 568-569. San Diego: Academic Press.

Grossman, T. (2016) Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,* 6.

Gu, H., Q. Cai, X. Dai, H. Wang, W. Xu, X. Cao & Y. Ye (2022) A case report of Klebsiella aerogenes-caused lumbar spine infection identified by metagenome next-generation sequencing. *BMC Infectious Diseases,* 22**,** 616.

Gu, H.-J., Q.-L. Sun, J.-C. Luo, J. Zhang & L. Sun (2019) A First Study of the Virulence Potential of a Bacillus subtilis Isolate From Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* Volume 9 - 2019.

Gudda, F., D. Muloi, F. Nganga, C. Nolari, Y. Gao & A. Moodley (2024) Antibiotic ecotoxicity and resistance risks in resource-constrained chicken and pig farming environments. *npj Antimicrobials and Resistance,* 2**,** 51.

Guedri Mkaddem, M., A. Zrig, M. Ben Abdallah, M. Romdhane, M. K. Okla, A. Al-Hashimi, Y. A. Alwase, M. Y. Hegab, M. M. Y. Madany, A. H. A. Hassan, G. T. S. Beemster & H. AbdElgawad (2022) Variation of the Chemical Composition of Essential Oils and Total Phenols Content in Natural Populations of Marrubium vulgare L. *Plants,* 11.

Guimarães, A. C., L. M. Meireles, M. F. Lemos, M. C. Guimarães, D. C. Endringer, M. Fronza & R. Scherer (2019) Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules,* 24.

Guo, F., Y. Wang, J. Peng, H. Huang, X. Tu, H. Zhao, N. Zhan, Z. Rao, G. Zhao & H. Yang (2022) Occurrence, distribution, and risk assessment of antibiotics in the aquatic environment of the Karst Plateau Wetland of Yangtze River Basin, Southwestern China. *International Journal of Environmental Research and Public Health,* 19**,** 7211.

Guo, M., M. Li, C. Zhang, X. Zhang & Y. Wu (2020) Dietary Administration of the Bacillus subtilis Enhances Immune Responses and Disease Resistance in Chickens. *Frontiers in Microbiology,* Volume 11 - 2020.

Guo, Q., Y. Zhou, S.-Y. Pang, Y. Gao, J. Duan, J. Li & J. Jiang (2021) Transformation and detoxification of sulfamethoxazole by permanganate (Mn(VII)) in the

presence of phenolic humic constituents. *Chemical Engineering Journal,* 413**,** 127534.

Guo, X., H. Chen, Y. Tong, X. Wu, C. Tang, X. Qin, J. Guo, P. Li, Z. Wang, W. Liu & J. Mo (2024) A review on the antibiotic florfenicol: Occurrence, environmental fate, effects, and health risks. *Environmental research,* 244.

Gutmann, L., R. Williamson, N. Moreau, M.-D. Kitzis, E. Collatz, J. F. Acar & F. W. Goldstein (1985) Cross-Resistance to Nalidixic Acid, Trimethoprim, and Chloramphenicol Associated with Alterations in Outer Membrane Proteins of Klebsiella, Enterobacter, and Serratia. *The Journal of Infectious Diseases,* 151**,** 501-507.

Gálvez-Iriqui, A. C., M. Plascencia-Jatomea & S. Bautista-Baños (2020) Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Rev. mex. fitopatol,* 38**,** 360-383.

Haag Andreas, F., J. R. Fitzgerald & R. Penadés José (2019) Staphylococcus aureus in Animals. *Microbiology Spectrum,* 7**,** 10.1128/microbiolspec.gpp3-0060-2019.

Haas, L. F. (1999) Papyrus of Ebers and Smith. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry,* 67**,** 578-578.

Hagenbuch, I. M. & J. L. Pinckney (2012) Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Research,* 46**,** 5028-5036.

Hamdi El Najjar, N., A. Touffet, M. Deborde, R. Journel & N. Karpel Vel Leitner (2014) Kinetics of paracetamol oxidation by ozone and hydroxyl radicals, formation of transformation products and toxicity. *Separation and Purification Technology,* 136**,** 137-143.

Hammesfahr, U., A. Kotzerke, M. Lamshöft, B.-M. Wilke, E. Kandeler & S. Thiele-Bruhn (2011) Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community. *European Journal of Soil Biology,* 47**,** 61-68.

Han, L., H. Zhang, Z. Long, Q. Ge, J. Mei, Y. Yu & H. Fang (2019) Exploring microbial community structure and biological function in manured soil during ten repeated treatments with chlortetracycline and ciprofloxacin. *Chemosphere,* 228**,** 469-477.

Hao, Y., J. Li & L. Shi (2021) A Carvacrol-Rich Essential Oil Extracted From Oregano (Origanum vulgare "Hot & Spicy") Exerts Potent Antibacterial Effects Against Staphylococcus aureus. *Frontiers in Microbiology,* 12.

Harrabi, M., D. A. M. Alexandrino, F. Aloulou, B. Elleuch, B. Liu, Z. Jia, C. M. R. Almeida, A. P. Mucha & M. F. Carvalho (2019) Biodegradation of oxytetracycline and enrofloxacin by autochthonous microbial communities from estuarine sediments. *Science of The Total Environment,* 648**,** 962-972.

Harris, M., T. Fasolino, D. Ivankovic, N. J. Davis & N. Brownlee (2023) Genetic Factors That Contribute to Antibiotic Resistance through Intrinsic and Acquired Bacterial Genes in Urinary Tract Infections. *Microorganisms,* 11.

Hartanto, Y., Y. Yaswari, M. Zunita, T. H. Soerawidjaja & A. Indarto (2017) Decolorization of crude terpineol by adsorption. *Separation Science and Technology,* 52**,** 1967-1972.

Hasso-Agopsowicz, M., E. Sparrow, A. M. Cameron, H. Sati, P. Srikantiah, S. Gottlieb, A. Bentsi-Enchill, K. Le Doare, M. Hamel, B. K. Giersing & W. P. Hausdorff (2024) The role of vaccines in reducing antimicrobial resistance: A review of potential impact of vaccines on AMR and insights across 16 vaccines and pathogens. *Vaccine,* 42**,** S1-S8.

Havelkova, B., M. Beklova, V. Kováčová, D. Hlávková & J. Pikula (2016) Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. *Neuro - endocrinology letters*.

Heinlaan, M., A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier & A. Kahru (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. *Chemosphere,* 71**,** 1308-1316.

Hemaiswarya, S., A. K. Kruthiventi & M. Doble (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine,* 15**,** 639-652.

Hendriksen, S. W. M., K. Orsel, J. A. Wagenaar & A. Miko (2011) Animal-to-Human Transmission of Salmonella Typhimurium DT104A Variant - Volume 10, Number 12—December 2004 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC.

Hernando, M. D., M. Ejerhoon, A. R. Fernández-Alba & Y. Chisti (2003) Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with Vibrio fischeri and Daphnia magna bioassays. *Water Research,* 37**,** 4091-4098.

Hitchcock, N. M., D. Devequi Gomes Nunes, J. Shiach, K. Valeria Saraiva Hodel, J. Dantas Viana Barbosa, L. Alencar Pereira Rodrigues, B. S. Coler, M. Botelho Pereira Soares & R. Badaró (2023) Current Clinical Landscape and Global Potential of Bacteriophage Therapy. *Viruses,* 15.

Hodiamont, C. J., A. K. van den Broek, S. L. de Vroom, J. M. Prins, R. A. A. Mathôt & R. M. van Hest (2022) Clinical Pharmacokinetics of Gentamicin in Various Patient Populations and Consequences for Optimal Dosing for Gram-Negative Infections: An Updated Review. *Clinical Pharmacokinetics,* 61**,** 1075-1094.

Hou, A.-m., D. Yang, J. Miao, D.-y. Shi, J. Yin, Z.-w. Yang, Z.-q. Shen, H.-r. Wang, Z.-g. Qiu, W.-l. Liu, J.-w. Li & M. Jin (2019) Chlorine injury enhances antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa through over expression of drug efflux pumps. *Water Research,* 156**,** 366-371.

Hou, G., Z. G. Wazir, J. Liu, G. Wang, F. Rong, Y. Xu, M. Li, K. Liu, A. Liu, H. Liu & F. Wang (2023) Effects of sulfadiazine and Cu on soil potential nitrification and ammonia-oxidizing archaea and bacteria communities across different soils. *Frontiers in Microbiology,* 14.

Hou, J. P. & J. W. Poole (1971) β-Lactam Antibiotics: Their Physicochemical Properties and Biological Activities in Relation to Structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 60**,** 503-532.

Howard, A., O. D. Michael, F. Audrey & R. D. and Sleator (2012) Acinetobacter baumannii. *Virulence,* 3**,** 243-250.

Hsu, L., A. Kwa, D. Lye, M. Chlebicki, T. Tan, M. Ling, S. Wong & L. Goh (2008) Reducing antimicrobial resistance through appropriate antibiotic usage in Singapore. *Singapore medical journal,* 49.

Hu, T., J. Zhang, X. Xu, X. Wang, C. Yang, C. Song, S. Wang & S. Zhao (2023) Bioaccumulation and trophic transfer of antibiotics in the aquatic and terrestrial food webs of the Yellow River Delta. *Chemosphere,* 323**,** 138211.

Hu, Z.-Q., W.-H. Zhao, N. Asano, Y. Yoda, Y. Hara & T. Shimamura (2002) Epigallocatechin Gallate Synergistically Enhances the Activity of Carbapenems against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 46**,** 558-560.

Huang, F., D. Zhou, B. Yan, B. Wang, F. Liu, X. Guan & S. Qu (2025) Global priority antibiotics integrated with their environmental occurrence and the health risks of antibiotic resistance genes. *Journal of Cleaner Production,* 490**,** 144778.

Huang, J., L. Yang, Y. Zou, S. Luo, X. Wang, Y. Liang, Y. Du, R. Feng & Q. Wei (2021) Antibacterial activity and mechanism of three isomeric terpineols of Cinnamomum longepaniculatum leaf oil. *Folia Microbiologica,* 66**,** 59-67.

Hugenholtz, P., M. Goebel Brett & R. Pace Norman (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology,* 180**,** 6793-6793.

Huisman, J. & F. Hulot (2005) Population dynamics of harmful cyanobacteria. Factors affecting species composition. *Journal of Organic Chemistry - J ORG CHEM***,** 143-176.

Hung, W.-S., M. Wu, S.-M. Jung & P.-H. Chu (2021) Infective endocarditis caused by Pasteurella aerogenes possibly from a Dog. *Clinical Infection in Practice,* 12**,** 100107.

Husna, A., M. M. Rahman, A. T. M. Badruzzaman, M. H. Sikder, M. R. Islam, M. T. Rahman, J. Alam & H. M. Ashour (2023) Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. *Biomedicines,* 11.

Hutchings, M. I., A. W. Truman & B. Wilkinson (2019) Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology,* 51**,** 72-80.

Huttner, A., J. Bielicki, M. N. Clements, N. Frimodt-Møller, A. E. Muller, J. P. Paccaud & J. W. Mouton (2020) Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical Microbiology and Infection,* 26**,** 871-879.

Iavicoli, I., L. Fontana, E. Agathokleous, C. Santocono, F. Russo, I. Vetrani, M. Fedele & E. J. Calabrese (2021) Hormetic dose responses induced by antibiotics in bacteria: A phantom menace to be thoroughly evaluated to address the environmental risk and tackle the antibiotic resistance phenomenon. *Science of The Total Environment,* 798**,** 149255.

Ibitoye, O. B. & T. O. Ajiboye (2019) Ferulic acid potentiates the antibacterial activity of quinolone-based antibiotics against Acinetobacter baumannii. *Microbial Pathogenesis,* 126**,** 393-398.

Imenshahidi, M. & H. Hosseinzadeh (2016) Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review. *Phytotherapy Research,* 30**,** 1745-1764.

Isidori, M., M. Lavorgna, A. Nardelli, L. Pascarella & A. Parrella (2005) Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of The Total Environment,* 346**,** 87-98.

ISO 19458:2006; Water Quality—Sampling for Microbiological Analysis. AENOR: Madrid, Spain, 2007

Izard, T. (2001) Structural basis for chloramphenicol tolerance in Streptomyces venezuelae by chloramphenicol phosphotransferase activity. *Protein Science,* 10**,** 1508-1513.

Jain, R. K., J. H. Dreisbach & J. C. Spain (1994) Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an Arthrobacter sp. *Applied and Environmental Microbiology,* 60**,** 3030-3032.

Jain, B. K., H. D. Duan, C. Valentine, A. Samiha, H. Li & T. R. Graham (2025) P4-ATPases control phosphoinositide membrane asymmetry and neomycin resistance. *Nature Cell Biology,* 27**,** 1114-1124.

Janssen Peter, H. (2006) Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology,* 72**,** 1719-1728.

Jeyanthi, V., P. Anbu, M. Vairamani & P. Velusamy (2016) Isolation of hydroquinone (benzene-1,4-diol) metabolite from halotolerant Bacillus methylotrophicus MHC10 and its inhibitory activity towards bacterial pathogens. *Bioprocess and Biosystems Engineering,* 39**,** 429-439.

Jeyanthi, V., P. Velusamy, G. V. Kumar & K. Kiruba (2021) Effect of naturally isolated hydroquinone in disturbing the cell membrane integrity of Pseudomonas aeruginosa MTCC 741 and Staphylococcus aureus MTCC 740. *Heliyon,* 7**,** e07021.

Jia, H.-J., P.-P. Jia, S. Yin, L.-K. Bu, G. Yang & D.-S. Pei (2023) Engineering bacteriophages for enhanced host range and efficacy: insights from bacteriophage-bacteria interactions. *Frontiers in Microbiology,* 14.

Jia, Y. H. (2009) Diversity of utilizing substrates of strain Dyella sp. la-4 and its application in soi remediation.

Jian, Z., L. Zeng, T. Xu, S. Sun, S. Yan, L. Yang, Y. Huang, J. Jia & T. Dou (2021) Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology,* 61**,** 1049-1070.

Jiang, Y., M. Li, C. Guo, D. An, J. Xu, Y. Zhang & B. Xi (2014) Distribution and ecological risk of antibiotics in a typical effluent–receiving river (Wangyang River) in north China. *Chemosphere,* 112**,** 267-274.

Jin, D., C.-Y. Kao, J. Darby & S. Palmer (2020) Salmonella typhimurium myopericarditis: A case report and review of literature. Retrieved January 30, 2025 from: http://www.wjgnet.com/.

Jin, D., X. Kong, B. Cui, S. Jin, Y. Xie, X. Wang & Y. Deng (2018) Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. *Scientific Reports,* 8**,** 13368.

Jitareanu, A., C. Ifrim, Z. Ana Maria, A. Trifan, U. StĂNescu & G. Tataringa (2019) Phytotoxicity evaluation of some dibrominated cinnamic acid derivatives on Phaseolus vulgaris. *Romanian Biotechnological Letters,* 24**,** 1015-1021.

Joshi, R., Y. A. Kulkarni & S. Wairkar (2018) Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. *Life Sciences,* 215**,** 43-56.

Jouybari, M. A., M. Ahanjan, B. Mirzaei & H. R. Goli (2021) Role of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylase (ArmA) in resistance of Acinetobacter baumannii clinical isolates against aminoglycosides. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* 54.

Jurica, K., I. Gobin, D. Kremer, D. V. Čepo, R. J. Grubešić, I. B. Karačonji & I. Kosalec (2017) Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (Arbutus unedo L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine,* 8**,** 17-23.

Kadlec, K., C. Kehrenberg & S. Schwarz (2007) Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in Bordetella bronchiseptica: identification of a novel chloramphenicol exporter. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 59**,** 191-196.

Kamatou, G. P. P., I. Vermaak, A. M. Viljoen & B. M. Lawrence (2013) Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry,* 96**,** 15-25.

Kang, J., L. Liu, Y. Liu & X. Wang (2020) Ferulic Acid Inactivates Shigella flexneri through Cell Membrane Destruction, Biofilm Retardation, and Altered Gene Expression.

Kapoor, G., S. Saigal & A. Elongavan (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology,* 33**,** 300.

Karthikeyan, K. G. & M. T. Meyer (2006) Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of The Total Environment,* 361**,** 196-207.

Karwowska, E. (2024) Antibiotic Resistance in the Farming Environment. *Applied Sciences,* 14.

Kashuba, A. D. M., J. S. Bertino & A. N. Nafziger (1998) Dosing of Aminoglycosides To Rapidly Attain Pharmacodynamic Goals and Hasten Therapeutic Response by Using Individualized Pharmacokinetic Monitoring of Patients with Pneumonia Caused by Gram-Negative Organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 42**,** 1842-1844.

Katz, L. & R. H. Baltz (2016) Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 43**,** 155-176.

Kaul, M. & D. S. Pilch (2002) Thermodynamics of Aminoglycoside−rRNA Recognition: The Binding of Neomycin-Class Aminoglycosides to the A Site of 16S rRNA. *Biochemistry,* 41**,** 7695-7706.

Kaur, R., A. Tiwari, M. Manish, I. K. Maurya, R. Bhatnagar & S. Singh (2021) Common garlic (Allium sativum L.) has potent Anti-Bacillus anthracis activity. *Journal of Ethnopharmacology,* 264**,** 113230.

Kaushik, H., R. Sharma & A. Kumar (2025) Natural products against resistant bacterial infections: A systematic literature review. *The Microbe,* 6**,** 100247.

Kazemi, A., A. Iraji, N. Esmaealzadeh, M. Salehi & M. H. Hashempur (2024) Peppermint and menthol: a review on their biochemistry, pharmacological activities, clinical applications, and safety considerations.

Ke, C.-Y., C. J. Mathias & M. A. Green (2003) The folate receptor as a molecular target for tumor-selective radionuclide delivery. *Nuclear Medicine and Biology,* 30**,** 811-817.

Keller, C. P., R. R. Barkosky, J. E. Seil, S. A. Mazurek & M. L. Grundstad (2008) The electrical response of Phaseolus vulgaris roots to abrupt exposure to hydroquinone. *Plant Signaling & Behavior,* 3**,** 633-640.

Kelmani Chandrakanth, R., S. Raju & S. A. Patil (2008) Aminoglycoside-Resistance Mechanisms in Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus Clinical Isolates. *Current Microbiology,* 56**,** 558-562.

Keyvani-Ghamsari, S., M. Rahimi & K. Khorsandi (2023) An update on the potential mechanism of gallic acid as an antibacterial and anticancer agent. *Food Science & Nutrition,* 11**,** 5856-5872.

Khaleel, C., N. Tabanca & G. Buchbauer (2018) α-Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. 16**,** 349-361.

Khanna, A., M. Khanna & A. Aggarwal (2012) Serratia Marcescens- A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit its Spread in Hospitalized Patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR,* 7**,** 243.

Kim, A., N. Kim, H. Roh, W. Chun, D. T. Ho, Y. Lee & D.-H. Kim (2019) Administration of antibiotics can cause dysbiosis in fish gut. *Aquaculture,* 512**,** 734330.

Kim, H., G. H. Yang, C. H. Choi, Y. S. Cho & G. Kim (2018) Gelatin/PVA scaffolds fabricated using a 3D-printing process employed with a low-temperature plate for hard tissue regeneration: Fabrication and characterizations. *International Journal of Biological Macromolecules,* 120**,** 119-127.

Kim, H. Y., J. Asselman, T.-Y. Jeong, S. Yu, K. A. C. De Schamphelaere & S. D. Kim (2017a) Multigenerational Effects of the Antibiotic Tetracycline on Transcriptional Responses of Daphnia magna and Its Relationship to Higher Levels of Biological Organizations. *Environmental Science & Technology,* 51**,** 12898-12907.

Kim, H. Y., J. Jeon, J. Hollender, S. Yu & S. D. Kim (2014) Aqueous and dietary bioaccumulation of antibiotic tetracycline in D. magna and its multigenerational transfer. *Journal of Hazardous Materials,* 279**,** 428-435.

Kim, K. R., G. Owens, Y. S. Ok, W. K. Park, D. B. Lee & S. I. Kwon (2012) Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting. *Waste Management,* 32**,** 110-116.

Kim, M.-H., S.-H. Jo, K.-S. Ha, J.-H. Song, H.-D. Jang & Y.-I. Kwon (2010) Antimicrobial activities of 1, 4-benzoquinones and wheat germ extract. *Journal of microbiology and biotechnology,* 20**,** 1204-1209.

Kim, S., J.-H. Lee, Y.-G. Kim, Y. Tan & J. Lee (2022a) Hydroquinones Inhibit Biofilm Formation and Virulence Factor Production in Staphylococcus aureus. *International Journal of Molecular Sciences,* 23.

Kim, S., P. Samanta, J. Yoo, W.-K. Kim & J. Jung (2017b) Time-Dependent Toxicity Responses in Daphnia magna Exposed to CuO and ZnO Nanoparticles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 98**,** 502-507.

Kim, Y.-G., J.-H. Lee, S. Park, K. Khadke Sagar, J.-J. Shim & J. Lee (2022b) Hydroquinones Including Tetrachlorohydroquinone Inhibit Candida albicans Biofilm Formation by Repressing Hyphae-Related Genes. *Microbiology Spectrum,* 10**,** e02536-22.

Kirchhelle, C. (2018) Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). *Palgrave Communications,* 4**,** 96.

Klein, E. Y., I. Impalli, S. Poleon, P. Denoel, M. Cipriano, T. P. Van Boeckel, S. Pecetta, D. E. Bloom & A. Nandi (2024) Global trends in antibiotic consumption during 2016–2023 and future projections through 2030. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 121**,** e2411919121.

Klein, E. Y., T. P. Van Boeckel, E. M. Martinez, S. Pant, S. Gandra, S. A. Levin, H. Goossens & R. Laxminarayan (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 115**,** E3463-E3470.

Klous, G., A. Huss, D. J. J. Heederik & R. A. Coutinho (2016) Human–livestock contacts and their relationship to transmission of zoonotic pathogens, a systematic review of literature. *One Health,* 2**,** 65-76.

Kobayashi, Y., N. Ohshiro, R. Sakai, M. Ohbayashi, N. Kohyama & T. Yamamoto (2005) Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 57**,** 573-578.

Kohanski, M. A., D. J. Dwyer & J. J. Collins (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology,* 8**,** 423-435.

Koike, S., I. G. Krapac, H. D. Oliver, A. C. Yannarell, J. C. Chee-Sanford, R. I. Aminov & R. I. Mackie (2007) Monitoring and Source Tracking of Tetracycline Resistance

Genes in Lagoons and Groundwater Adjacent to Swine Production Facilities over a 3-Year Period. *Applied and Environmental Microbiology,* 73**,** 4813-4823.

Kolpin, D. W., E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber & H. T. Buxton (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environmental science & technology,* 36**,** 1202-1211.

Koner, S., J.-S. Chen, B.-M. Hsu, C.-W. Tan, C.-W. Fan, T.-H. Chen, B. Hussain & V. Nagarajan (2021) Assessment of Carbon Substrate Catabolism Pattern and Functional Metabolic Pathway for Microbiota of Limestone Caves. *Microorganisms,* 9.

Kong, K.-F., L. Schneper & K. Mathee (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS,* 118**,** 1-36.

Kong, W. D., Y. G. Zhu, B. J. Fu, P. Marschner & J. Z. He (2006) The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environmental Pollution,* 143**,** 129-137.

Kong, W. D., Y. G. Zhu, Y. C. Liang, J. Zhang, F. A. Smith & M. Yang (2007) Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (Medicago sativa L.). *Environmental Pollution,* 147**,** 187-193.

Kopejtka, K., J. Tomasch, Y. Zeng, M. Tichy, D. Sorokin & M. Koblizek (2017) Genomic Analysis of the Evolution of Phototrophy among Haloalkaliphilic Rhodobacterales. *Genome Biology and Evolution,* 9**,** 1950-1962.

Kormos, D., K. Lin, A. Pruden & L. C. Marr (2022) Critical review of antibiotic resistance genes in the atmosphere. *Environmental Science: Processes & Impacts,* 24**,** 870-883.

Korzeniewska, E. & M. Harnisz (2018) Relationship between modification of activated sludge wastewater treatment and changes in antibiotic resistance of bacteria. *Science of The Total Environment,* 639**,** 304-315.

Kotzerke, A., S. Klemer, K. Kleineidam, M. A. Horn, H. L. Drake, M. Schloter & B.-M. Wilke (2010) Manure contaminated with the antibiotic sulfadiazine impairs the abundance of nirK- and nirS-type denitrifiers in the gut of the earthworm Eisenia fetida. *Biology and Fertility of Soils,* 46**,** 415-418.

Kounatidis, D., M. Dalamaga, E. Grivakou, I. Karampela, P. Koufopoulos, V. Dalopoulos, N. Adamidis, E. Mylona, A. Kaziani & N. G. Vallianou (2024) Third-Generation Tetracyclines: Current Knowledge and Therapeutic Potential. *Biomolecules,* 14.

Kołodziejska, M., J. Maszkowska, A. Białk-Bielińska, S. Steudte, J. Kumirska, P. Stepnowski & S. Stolte (2013) Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere,* 92**,** 1253-1259.

Kraemer, S. A., A. Ramachandran & G. G. Perron (2019) Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms,* 7.

Krapež, P., M. Lunder, M. Oder & R. Fink (2024) Evaluation of the In Vitro Disinfection Potential of the Phytochemicals Linalool and Citronellal Against Biofilms Formed by Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Processes,* 12.

Kravanja, G., M. Primožič, Ž. Knez & M. Leitgeb (2019) Chitosan-Based (Nano)Materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules,* 24**,** 1960.

Kuhnert, P., B. Heyberger-Meyer, J. Nicolet & J. Frey (2000) Characterization of PaxA and Its Operon: a Cohemolytic RTX Toxin Determinant from Pathogenic Pasteurella aerogenes. *Infection and Immunity,* 68**,** 6-12.

Kulik, K., A. Lenart-Boroń & K. Wyrzykowska (2023) Impact of Antibiotic Pollution on the Bacterial Population within Surface Water with Special Focus on Mountain Rivers. *Water,* 15.

Kumar, K., S. C. Gupta, S. K. Baidoo, Y. Chander & C. J. Rosen (2005) Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *Journal of Environmental Quality,* 34**,** 2082-2085.

Kungolos, A., S. Hadjispyrou, M. Petala, V. Tsiridis, P. Samaras & G. Sakellaropoulos (2004) Toxic Properties of Metals and Organotin Compounds and Their Interactions on Daphnia magna and Vibrio fischeri. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus,* 4**,** 101-110.

Kusama, Y., S. Tsuzuki, Y. Muraki, R. Koizumi, M. Ishikane & N. Ohmagari (2021) The effects of Japan's National Action Plan on Antimicrobial Resistance on antimicrobial use. *International Journal of Infectious Diseases,* 103**,** 154-156.

Kuznetsova, T. V., G. V. Sladkova & S. V. Kholodkevich (2010) Evaluation of functional state of crayfish Pontastacus leptodactylus in normal and toxic environment by characteristics of their cardiac activity and hemolymph biochemical parameters. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology,* 46**,** 241-250.

Kyriakidis, I., E. Vasileiou, Z. D. Pana & A. Tragiannidis (2021) Acinetobacter baumannii Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens,* 10.

Kümmerer, K. (2003) Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 52**,** 5-7.

Lalumera, G., D. Calamari, P. Galli, S. Castiglioni, G. Crosa & R. Fanelli (2004) Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere,* 54.

Langeveld, W. T., E. J. A. Veldhuizen & S. A. Burt (2014) Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology,* 40**,** 76-94.

Larsson, D. G. J. & C.-F. Flach (2022) Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology,* 20**,** 257-269.

Leber, A. 2016. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 5.16.1-5.16.23.

Lee, M.-K. (2020) Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics,* 12.

Lee, S., C. Kim, X. Liu, S. Lee, Y. Kho, W.-K. Kim, P. Kim & K. Choi (2021) Ecological Risk Assessment of Amoxicillin, Enrofloxacin, and Neomycin: Are Their Current Levels in the Freshwater Environment Safe? *Toxics,* 9.

Lenardão, E. J., G. V. Botteselle, F. de Azambuja, G. Perin & R. G. Jacob (2007) Citronellal as key compound in organic synthesis. *Tetrahedron,* 63**,** 6671-6712.

Lesniak, W., V. L. Pecoraro & J. Schacht (2005) Ternary Complexes of Gentamicin with Iron and Lipid Catalyze Formation of Reactive Oxygen Species. *Chemical Research in Toxicology,* 18**,** 357-364.

Li, A., H. Wu, Y. Feng, S. Deng, A. Hou, F. Che, Y. Liu, Q. Geng, H. Ni & Y. Wei (2020a) A strategy of rapidly screening out herbicidal chemicals from Eucalyptus essential oils. *Pest Management Science,* 76**,** 917-927.

Li, D., Y. Rui, S. Guo & F. Luan (2021) Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life sciences,* 284.

Li, J., E. M. Perdue, S. G. Pavlostathis & R. Araujo (1998) Physicochemical properties of selected monoterpenes. *Environment International,* 24**,** 353-358.

Li, J., H. Yang, K. Qin, L. Wei, X. Xia, F. Zhu, X. Tan, C. Xue & Q. Zhao (2022) Effect of pig manure-derived sulfadiazine on species distribution and bioactivities of soil ammonia-oxidizing microorganisms after fertilization. *Journal of Hazardous Materials,* 423**,** 126994.

Li, L., C. Shi, Z. Yin, R. Jia, L. Peng, S. Kang & Z. Li (2014) Antibacterial activity of α-terpineol may induce morphostructural alterations in Escherichia coli. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology],* 45**,** 1409-13.

Li, L.-L., L. Huang, R.-S. Chung, K.-H. Fok & Y.-S. Zhang (2010) Sorption and Dissipation of Tetracyclines in Soils and Compost. *Pedosphere,* 20**,** 807-816.

Li, P., T. Zhu, D. Zhou, W. Lu, H. Liu, Z. Sun, J. Ying, J. Lu, X. Lin & K. Li (2020b) Analysis of resistance to florfenicol and the related mechanism of dissemination in different animal-derived bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 10**,** 369.

Li, T., Y. Yang, H. Qi, W. Cui, L. Zhang, X. Fu, X. He, M. Liu, P.-f. Li & T. Yu (2023) CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy,* 8**,** 36.

Li, W., Y. Li, X. Jiang, X. Li & Z. Yu (2018) Compound Ammonium Glycyrrhizin Protects Hepatocytes from Injury Induced by Lipopolysaccharide/Florfenicol through a Mitochondrial Pathway. *Molecules,* 23.

Li, W., Y. Shi, L. Gao, J. Liu & Y. Cai (2012) Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere,* 89**,** 1307-1315.

Li, W., Q. Xiao, C. Hu, B. Liu & R. Sun (2019) A comparison of the efficiency of different urease inhibitors and their effects on soil prokaryotic community in a short-term incubation experiment. *Geoderma,* 354**,** 113877.

Liao, Q., M. Li, Y. Dong, M. Wu, Z. Meng, Q. Zhang & A. Liu (2019) Impacts of Cu and sulfadiazine on soil potential nitrification and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Pollutants and Bioavailability,* 31**,** 60-69.

Liao, Q., H. Rong, M. Zhao, H. Luo, Z. Chu & R. Wang (2021) Interaction between tetracycline and microorganisms during wastewater treatment: A review. *Science of The Total Environment,* 757**,** 143981.

Liess, M., S. Henz & N. Shahid (2020) Modeling the synergistic effects of toxicant mixtures. *Environmental Sciences Europe,* 32**,** 119.

Limna Mol, V. P., A. Abdulaziz, K. G. Sneha, P. J. Praveen, T. V. Raveendran & P. S. Parameswaran (2020) Inhibition of pathogenic Vibrio harveyi using calamenene, derived from the Indian gorgonian Subergorgia reticulata, and its synthetic analog. *3 Biotech,* 10**,** 248.

Lin, D., Q. Zhou, Y. Xu, C. Chen & Y. Li (2012) Physiological and molecular responses of the earthworm (Eisenia fetida) to soil chlortetracycline contamination. *Environmental Pollution,* 171**,** 46-51.

Lin, H., D. Jin, T. E. Freitag, W. Sun, Q. Yu, J. Fu & J. Ma (2016) A compositional shift in the soil microbiome induced by tetracycline, sulfamonomethoxine and ciprofloxacin entering a plant-soil system. *Environmental Pollution,* 212**,** 440-448.

Lin, J., J. Chen, Y. Wang, X. Cai, X. Wei & X. Qiao (2008) More Toxic and Photoresistant Products from Photodegradation of Fenoxaprop-p-ethyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 56**,** 8226-8230.

Liu, B.-M., J. Zhang, C.-L. Bai, X. Wang, X.-Z. Qiu, X.-L. Wang, H. Ji & B. Liu (2015) Spectroscopic study on flavonoid–drug interactions: Competitive binding for human serum albumin between three flavonoid compounds and ticagrelor, a new antiplatelet drug. *Journal of Luminescence,* 168**,** 69-76.

Liu, F., J. Wu, G.-G. Ying, Z. Luo & H. Feng (2012) Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 95**,** 1615-1623.

Liu, L., Z. Chen, W. Liu, X. Ke, X. Tian & J. Chu (2022) Cephalosporin C biosynthesis and fermentation in Acremonium chrysogenum. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 106**,** 6413-6426.

Liu, M., J. Cao & C. Wang (2020) Bioremediation by earthworms on soil microbial diversity and partial nitrification processes in oxytetracycline-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 189**,** 109996.

Liu, S., P. Wang, C. Wang, J. Chen, X. Wang, B. Hu & Q. Yuan (2021) Ecological insights into the disturbances in bacterioplankton communities due to emerging organic pollutants from different anthropogenic activities along an urban river. *Science of The Total Environment,* 796**,** 148973.

Liu, Y., R. Guo, S. Tang, F. Zhu, S. Zhang, Z. Yan & J. Chen (2018) Single and mixture toxicities of BDE-47, 6-OH-BDE-47 and 6-MeO-BDE-47 on the feeding activity of Daphnia magna: From behavior assessment to neurotoxicity. *Chemosphere,* 195**,** 542-550.

Liu, Z., L. Delgado-Moreno, Z. Lu, S. Zhang, Y. He, X. Gu, Z. Chen, Q. Ye, J. Gan & W. Wang (2019) Inhibitory effects of dissolved organic matter on erythromycin bioavailability and possible mechanisms. *Journal of Hazardous Materials,* 375**,** 255-263.

Liu, Z., X. Jiang, J. Li, W. Ji, H. Zhou, X. Gong, B. Miao, S. Meng, L. Duan, Q. Shi, X. Han, P. Gao, C. Chang, A. Dong & J. Li (2023) Molecular characteristics and antibiotic resistance mechanisms of clindamycin-resistant Streptococcus agalactiae isolates in China. *Frontiers in Microbiology,* 14.

Llor, C., R. Benkő & L. Bjerrum (2024) Global restriction of the over-the-counter sale of antimicrobials: does it make sense? *Frontiers in Public Health,* 12.

Lo, J.-T., T.-M. Lee & B.-H. Chen (2016) Nonionic Microemulsions as Solubilizers of Hydrophobic Drugs: Solubilization of Paclitaxel. *Materials,* 9.

Lomba, L., D. Lapeña, N. Ros, E. Aso, M. Cannavò, D. Errazquin & B. Giner (2020) Ecotoxicological study of six drugs in Aliivibrio fischeri, Daphnia magna and Raphidocelis subcapitata. *Environmental Science and Pollution Research,* 27**,** 9891-9900.

Loo, L. W., Y. X. Liew, W. Lee, L. W. Lee, P. Chlebicki & A. L.-H. Kwa (2019) Discontinuation of antibiotic therapy within 24 hours of treatment initiation for patients with no clinical evidence of bacterial infection: a 5-year safety and outcome study from Singapore General Hospital Antimicrobial Stewardship Program. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 53**,** 606-611.

Lorenzo, P., A. Adriana, S. Jessica, B. Carles, F. Marinella, L. Marta, B. J. Luis & S. Pierre (2018) Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere,* 206**,** 70-82.

Lorusso, A. B., J. A. Carrara, C. D. Barroso, F. F. Tuon & H. Faoro (2022) Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Molecular Sciences,* 23.

Loureiro, A. & G. J. da Silva (2019) CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics,* 8.

Lovern, S. B. & R. Van Hart (2022) Impact of oxytetracycline exposure on the digestive system microbiota of Daphnia magna. *PLOS ONE,* 17**,** e0265944.

Lozano, I. C. (2024) One Health desde la farmacia: uniendo fuerzas por la salud global. *Revista de Salud Ambiental,* 24**,** 139-141.

Lu, N., Y. Lu, F. Liu, K. Zhao, X. Yuan, Y. Zhao, Y. Li, H. Qin & J. Zhu (2013) H3PW12O40/TiO2 catalyst-induced photodegradation of bisphenol A (BPA): Kinetics, toxicity and degradation pathways. *Chemosphere,* 91**,** 1266-1272.

Luo, L., Q. Li, C. Xing, C. Li, Y. Pan, H. Sun, X. Yu, K. Wen, J. Shen & Z. Wang (2025) Antibody-based therapy: An alternative for antimicrobial treatment in the post-antibiotic era. *Microbiological Research,* 290**,** 127974.

Löffler, D. & T. A. Ternes (2003) Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* 1000**,** 583-588.

Ma, C., N. He, Y. Zhao, D. Xia, J. Wei & W. Kang (2019) Antimicrobial Mechanism of Hydroquinone. *Applied biochemistry and biotechnology,* 189.

Ma, F., S. Xu, Z. Tang, Z. Li & L. Zhang (2021) Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health,* 3**,** 32-38.

Ma, H., B. Krock, U. Tillmann, U. Bickmeyer, M. Graeve & A. Cembella (2011) Mode of action of membrane-disruptive lytic compounds from the marine dinoflagellate Alexandrium tamarense. *Toxicon,* 58**,** 247-258.

Ma, T., X. Pan, L. k. Chen, W. Liu, P. Christie, Y. Luo & L. Wu (2016) Effects of different concentrations and application frequencies of oxytetracycline on soil enzyme activities and microbial community diversity. *European Journal of Soil Biology,* 76**,** 53-60.

Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 1997. *Brock biology of microorganisms*. Prentice hall Upper Saddle River, NJ.

Madigan TM, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Brock S. Biología de los microorganismos 2015. Pearson Educacion, Madrid, ISBN 978-84-9035- 279-3 (14a edicion).

Madyastha, K. M. & V. Renganathan (1984) Metabolism of α-terpineol by Pseudomonas incognita. *Canadian Journal of Microbiology,* 30**,** 1429-1436.

Magdaleno, A., S. Carusso & J. Moretton (2017) Toxicity and Genotoxicity of Three Antimicrobials Commonly Used in Veterinary Medicine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 99**,** 315-320.

Mahizan, N. A., S.-K. Yang, C.-L. Moo, A. A. Song, C.-M. Chong, C.-W. Chong, A. Abushelaibi, S.-H. E. Lim & K.-S. Lai (2019) Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules,* 24.

Malecky, M., H. Albarello & L. P. Broudiscou (2012) Degradation of terpenes and terpenoids from Mediterranean rangelands by mixed rumen bacteria in vitro. *Animal,* 6**,** 612-616.

Malik, H., R. Singh, S. Kaur, P. Dhaka, J. S. Bedi, J. P. S. Gill & G. Gongal (2023) Review of antibiotic use and resistance in food animal production in WHO South-East Asia Region. *Journal of Infection and Public Health,* 16**,** 172-182.

Manyi-Loh, C., S. Mamphweli, E. Meyer & A. Okoh (2018) Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules,* 23.

Marchi, J., S. Zborowsky, L. Debarbieux & J. S. Weitz (2023) The dynamic interplay of bacteriophage, bacteria and the mammalian host during phage therapy. *iScience,* 26.

Marchlewicz, A., U. Guzik & D. Wojcieszyńska (2015) Over-the-Counter Monocyclic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environment—Sources, Risks, Biodegradation. *Water, Air, & Soil Pollution,* 226**,** 355.

Mario, E., D. Hamza & K. Abdel-Moein (2023) Hypervirulent Klebsiella pneumoniae among diarrheic farm animals: A serious public health concern. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases,* 102**,** 102077.

Marmulla, R. & J. Harder (2014) Microbial monoterpene transformations—a review. *Frontiers in Microbiology,* Volume 5 - 2014.

Martin, M. J., S. E. Thottathil & T. B. Newman (2015) Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. *American Journal of Public Health,* 105**,** 2409-2410.

Martinez, J. L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution,* 157**,** 2893-2902.

Martins, A., L. Guimarães & L. Guilhermino (2013) Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to Daphnia magna assessed at two temperatures. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 36**,** 1022-1032.

Martorano-Fernandes, L., M. Lacerda, Y. Cavalcanti & L. Almeida (2021) Cinnamaldehyde and α-terpineol inhibit the growth of planktonic cultures of Candida albicans and non albicans. *Research, Society and Development,* 10**,** e554101019027.

Martínez, J. L., F. Baquero & D. I. Andersson (2011) Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology,* 11**,** 439-445.

Maseda, H., Y. Hashida, R. Konaka, A. Shirai & H. Kourai (2009) Mutational Upregulation of a Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Multidrug Efflux Pump, SdeAB, upon Exposure to a Biocide, Cetylpyridinium Chloride, and Antibiotic Resistance in Serratia marcescens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 53**,** 5230-5235.

Massé, D. I., N. M. C. Saady & Y. Gilbert (2014) Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals,* 4**,** 146-163.

Matejczyk, M., R. Świsłocka, A. Golonko, W. Lewandowski & E. Hawrylik (2018) Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences,* 63**,** 14-21.

Matthew J Cheesman, A. I., Baxter Blonk, Ian E Cock (2017) Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant

Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? *Pharmacognosy Reviews,* 11**,** 57-72.

Mauldin Patrick, D., D. Salgado Cassandra, S. Hansen Ida, T. Durup Darshana & A. Bosso John (2010) Attributable Hospital Cost and Length of Stay Associated with Health Care-Associated Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 54**,** 109-115.

McCulloch, T. R., T. J. Wells & F. Souza-Fonseca-Guimaraes (2022) Towards efficient immunotherapy for bacterial infection. *Trends in Microbiology,* 30**,** 158-169.

McGregor, G., L. Fabbro & J. Lobegeiger (2007) Freshwater planktic Chroococcales (Cyanoprokaryota) from North-Eastern Australia: A morphological evaluation. *Nova Hedwigia,* 84**,** 299-331.

McNamara, P. J. & M. Leggas. 2009. Chapter 7 - Drug Distribution. In *Pharmacology,* eds. M. Hacker, W. Messer & K. Bachmann, 113-129. San Diego: Academic Press.

Medina-Sauza, R., M. Álvarez Jiménez, A. Delhal, F. Reverchon, M. Blouin, J. Guerrero-Analco, C. R. Cerdán, R. Guevara, L. Villain & I. Barois (2019) Earthworms Building Up Soil Microbiota, a Review. *Frontiers in Environmental Science,* 7.

Melles-Brewer, M., F. Chiara, D. Mosissa & P. Mathew (2024) Over-the-counter sales of antibiotics: a call to action to ensure access and prevent excess. *The Lancet Global Health,* 12**,** e1227-e1228.

Mendes, F., F. Silva, E. Sousa, F. Rodrigues, J. Costa, F. Monte, T. Lemos & J. Assunção (2015) Essential oil of Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): Chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics. *Journal of Essential Oil Research,* 27.

Menz, J., E. Baginska, Å. Arrhenius, A. Haiß, T. Backhaus & K. Kümmerer (2017) Antimicrobial activity of pharmaceutical cocktails in sewage treatment plant effluent – An experimental and predictive approach to mixture risk assessment. *Environmental Pollution,* 231**,** 1507-1517.

Micoli, F., F. Bagnoli, R. Rappuoli & D. Serruto (2021) The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology,* 19**,** 287-302.

Miller, V., J. Reedy, F. Cudhea, J. Zhang, P. Shi, et al. (2022) Global, regional, and national consumption of animal-source foods between 1990 and 2018: findings from the Global Dietary Database. *The Lancet Planetary Health,* 6**,** e243-e256.

Miller, W. R., J. M. Munita & C. A. Arias (2014) Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy,* 12**,** 1221-1236.

Misra, G., S. G. Pavlostathis, E. M. Perdue & R. Araujo (1996) Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 45**,** 831-838.

Mitchell, S. M., J. L. Ullman, A. L. Teel & R. J. Watts (2014) pH and temperature effects on the hydrolysis of three β-lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Science of The Total Environment,* 466-467**,** 547-555.

Miyazaki, K. & K. Kitahara (2018) Functional metagenomic approach to identify overlooked antibiotic resistance mutations in bacterial rRNA. *Scientific Reports,* 8**,** 5179.

Mlynarczyk-Bonikowska, B., C. Kowalewski, A. Krolak-Ulinska & W. Marusza (2022) Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Staphylococcus aureus. *International Journal of Molecular Sciences,* 23.

Modrzejewski, D., F. Hartung, H. Lehnert, T. Sprink, C. Kohl, J. Keilwagen & R. Wilhelm (2020) Which Factors Affect the Occurrence of Off-Target Effects Caused by the Use of CRISPR/Cas: A Systematic Review in Plants. *Frontiers in Plant Science,* Volume 11 - 2020.

Moghimi, R., L. Ghaderi, H. Rafati, A. Aliahmadi & D. J. McClements (2016) Superior antibacterial activity of nanoemulsion of Thymus daenensis essential oil against E. coli. *Food Chemistry,* 194**,** 410-415.

Mollema, F. P. N., J. H. Richardus, M. Behrendt, N. Vaessen, W. Lodder, W. Hendriks, H. A. Verbrugh & M. C. Vos (2010) Transmission of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus to Household Contacts. *Journal of Clinical Microbiology,* 48**,** 202-207.

Mondrala, S. & D. A. Eastmond (2010) Topoisomerase II inhibition by the bioactivated benzene metabolite hydroquinone involves multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions,* 184**,** 259-268.

Morak-Młodawska, B., M. Jeleń, E. Martula & R. Korlacki (2023) Study of Lipophilicity and ADME Properties of 1,9-Diazaphenothiazines with Anticancer Action. *International Journal of Molecular Sciences,* 24.

Morales-Espinosa, R., G. Delgado, F. Espinosa-Camacho, A. Flores-Alanis, C. Rodriguez, J. L. Mendez, A. Gonzalez-Pedraza & A. Cravioto (2024) Pseudomonas aeruginosa strains isolated from animal with high virulence genes content and highly sensitive to antimicrobials. *Journal of Global Antimicrobial Resistance,* 37**,** 75-80.

Moreira, M. R., G. M. P. Cruz, M. S. Lopes, A. A. C. Albuquerque & J. H. Leal-Cardoso (2001) Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 34.

Morris, F. C., C. Dexter, X. Kostoulias, M. I. Uddin & A. Y. Peleg (2019) The Mechanisms of Disease Caused by Acinetobacter baumannii. *Frontiers in Microbiology,* Volume 10 - 2019.

Morshdy, A. E. M. A., K. M. E. Abdallah, H. E. Abdallah, F. D. Algahtani, M. T. Elabbasy, S. Atique, K. Ahmad, M. A. A. Al-Najjar, H. M. Abdallah & A. F. A. Mahmoud (2023) Potential of Natural Phenolic Compounds as Antimicrobial Agents against Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus in Chicken Meat. *Molecules,* 28.

Mugwaneza, D., E. Rwagasore, Z. El-Khatib, P. Dukuziyaturemye, J. Omolo, O. Nsekuye, S. Rwunganira & M. Manzi (2024) Factors Associated with Inappropriate Use of Antibiotics Among Animal Health Professionals in Selected Districts of Rwanda, 2021. *Journal of Epidemiology and Global Health,* 14**,** 265-273.

Mulani, M. S., E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre & K. R. Pardesi (2025) Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology,* 10**,** 539.

Muneer, M., H. K. Singh & D. Bahnemann (2002) Semiconductor-mediated photocatalysed degradation of two selected priority organic pollutants, benzidine and 1,2-diphenylhydrazine, in aqueous suspension. *Chemosphere,* 49**,** 193-203.

Murray, C. J. L., K. S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski, et al. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet,* 399**,** 629-655.

Muteeb, G., M. T. Rehman, M. Shahwan & M. Aatif (2023) Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals,* 16.

Müller, H.-G. (1982) Sensitivity ofDaphnia magna straus against eight chemotherapeutic agents and two dyes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 28**,** 1-2.

Nagata, Y., T. Osono, M. Hasegawa, S. Hobara, D. Hirose, Y. Tanabe, S. Kudoh & M. Uchida (2023) Application of the Biolog EcoPlate™ technique for assessing the microbial metabolic diversity in moss profiles of continental Antarctica. *Polar Science,* 35**,** 100924.

Naghavi, M., S. E. Vollset, K. S. Ikuta, et al. (2024) Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. The Lancet, 404, 1199-1226.

Nakauchi, M., S. Ikemoto, H. Yamanishi, Y. Ozaki, T. Tsuno, E. Nomura, A. Hosoda & H. Taniguchi (2002) Antimicrobial activities of synthetic ferulic acid derivatives. *Food Preservation Science,* 28**,** 183-188.

Narciso-da-Rocha, C. & C. M. Manaia (2016) Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. *Science of The Total Environment,* 563**,** 1-9.

National Center for Biotechnology Information (2025a). Ferulic acid. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid.

National Center for Biotechnology Information (2025b). Citronellal. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citronellal.

National Center for Biotechnology Information (2025c). Hydroquinone. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroquinone.

National Center for Biotechnology Information (2025d). Menthol. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol.

National Center for Biotechnology Information (2025e). Naringenin. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin.

National Center for Biotechnology Information (2025f). Quercetin. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin.

National Center for Biotechnology Information (2025g). Alpha-Terpineol. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alpha-Terpineol.

National Center for Biotechnology Information (2025h). Amoxicillin. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin.

National Center for Biotechnology Information (2025i). Ampicillin. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin.

National Center for Biotechnology Information (2025j). Chloramphenicol. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloramphenicol.

National Center for Biotechnology Information (2025k). Erythromycin. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erythromycin.

National Center for Biotechnology Information (2025l). Gentamicin. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gentamicin.

National Center for Biotechnology Information (2025m). Neomycin. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neomycin.

National Center for Biotechnology Information (2025n). Oxytetracycline. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxytetracycline.

National Center for Biotechnology Information (2025o). Penicillin G. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicillin-G.

National Center for Biotechnology Information (2025p). Sulfadiazine. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfadiazine.

National Center for Biotechnology Information (2025q). Tetracycline. Retrieved January 20, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline.

Nelson, R. E., K. M. Hatfield, H. Wolford, M. H. Samore, R. D. Scott, II, S. C. Reddy, B. Olubajo, P. Paul, J. A. Jernigan & J. Baggs (2021) National Estimates of Healthcare Costs Associated With Multidrug-Resistant Bacterial Infections Among Hospitalized Patients in the United States. *Clinical Infectious Diseases,* 72**,** S17-S26.

Ng, K., N. A. Alygizakis, N. S. Thomaidis & J. Slobodnik (2023) Wide-Scope Target and Suspect Screening of Antibiotics in Effluent Wastewater from Wastewater Treatment Plants in Europe. *Antibiotics,* 12.

Ng, W.-J., C.-S. Shit, K.-Y. Ee & T.-T. Chai. 2021. Plant Natural Products for Mitigation of Antibiotic Resistance. In *Sustainable Agriculture Reviews 49: Mitigation of Antimicrobial Resistance Vol 2. Natural and Synthetic Approaches,* eds. H. Panwar, C. Sharma & E. Lichtfouse, 57-91. Cham: Springer International Publishing.

Ngigi, A. N., M. M. Magu & B. M. Muendo (2019) Occurrence of antibiotics residues in hospital wastewater, wastewater treatment plant, and in surface water in Nairobi County, Kenya. *Environmental Monitoring and Assessment,* 192**,** 18.

Nguyen, T. L. A. & D. Bhattacharya (2022) Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules,* 27**,** 2494.

Nielson, C., S. Hsu & K. Motaparthi. 2021. 41 - Topical Antibacterial Agents. In *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy (Fourth Edition),* ed. S. E. Wolverton, 465-479.e9. Elsevier.

Nightingale, K. K., Y. H. Schukken, C. R. Nightingale, E. D. Fortes, A. J. Ho, Z. Her, Y. T. Grohn, P. L. McDonough & M. Wiedmann (2004) Ecology and Transmission of Listeria monocytogenes Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Applied and Environmental Microbiology,* 70**,** 4458-4467.

Nijsingh, N., C. Munthe & D. G. J. Larsson (2019) Managing pollution from antibiotics manufacturing: charting actors, incentives and disincentives. *Environmental Health,* 18**,** 95.

Noor Uddin, G. M., M. H. Larsen, L. Barco, T. Minh Phu & A. Dalsgaard (2015) Clonal Occurrence of Salmonella Weltevreden in Cultured Shrimp in the Mekong Delta, Vietnam. *PLOS ONE,* 10**,** e0134252.

Norr, C. & F. Riepert (2007) Bioaccumulation studies with Eisenia fetida using an established degradation test system. *Journal of Soils and Sediments,* 7**,** 393-397.

Nunez, N., D.-B. Aurélie, T. Nicolas, L. Goran, L. Alexandre, M.-N. Françoise, C. Anne-Marie, B. Hélène, S. Pascale & C. and Archambaud (2022) The unforeseen intracellular lifestyle of Enterococcus faecalis in hepatocytes. *Gut Microbes,* 14**,** 2058851.

O'Neill, J. I. M. (2014) Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrob. Resist.*

O'Sullivan, L. A., J. Rinna, G. Humphreys, A. J. Weightman & J. C. Fry (2006) Culturable phylogenetic diversity of the phylum 'Bacteroidetes' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family Flavobacteriaceae: Epilithonimonas tenax gen. nov., sp. nov. and Persicivirga xylanidelens gen. nov., sp. nov.

Oaks, R. J. & R. Cindass (2023) Silver Sulfadiazine.

Ocan, M., E. A. Obuku, F. Bwanga, D. Akena, S. Richard, J. Ogwal-Okeng & C. Obua (2015) Household antimicrobial self-medication: a systematic review and meta-analysis of the burden, risk factors and outcomes in developing countries. *BMC Public Health,* 15**,** 742.

Odds, F. (2003) Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *The Journal of antimicrobial chemotherapy,* 52.

Olawade, D., O. Fapohunda, E. Egbon, O. Ebiesuwa, S. Usman, A. O. Faronbi & S. Fidelis (2024) Phage Therapy: A Targeted Approach to Overcoming Antibiotic Resistance. *Microbial Pathogenesis,* 197**,** 107088.

Oliveira, F. d. S., T. S. d. Freitas, R. P. d. Cruz, M. d. S. Costa, R. L. S. Pereira, L. J. Quintans-Júnior, T. d. A. Andrade, P. d. P. Menezes, B. M. H. d. Sousa, P. S. Nunes, M. R. Serafini, I. R. A. d. Menezes, A. A. d. S. Araújo & H. D. M. Coutinho (2017) Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α-bisabolol, β-cyclodextrin and α-bisabolol/β-cyclodextrin complex. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 92**,** 1111-1118.

Oliver, J. P., C. A. Gooch, S. Lansing, J. Schueler, J. J. Hurst, L. Sassoubre, E. M. Crossette & D. S. Aga (2020) Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of Dairy Science,* 103**,** 1051-1071.

Oong, G. C. & P. Tadi (2023) Chloramphenicol.

Orand, J. (2024) One hundred years of success in antimicrobials: but what will the next 100 years bring? *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics),* Special Edition.

Orchard, S. J., D. A. Holdway, C. Barata & R. A. Van Dam (2002) A Rapid Response Toxicity Test Based on the Feeding Rate of the Tropical Cladoceran Moinodaphnia macleayi. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 53**,** 12-19.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2; OECD: Paris, France, 2004.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2; OECD: Paris, France, 1984

Ortega, C., O. Gimeno, V. Blanc, M. Cortés, A. S & L. M (2006) Antibiotic susceptibility of strains of Aeromonas salmonicida isolated from spanish salmonids. *Revue de médecine vétérinaire,* 157**,** 1-5.

Osipiuk, J., S.-A. Azizi, S. Dvorkin, M. Endres, R. Jedrzejczak, K. A. Jones, S. Kang, R. S. Kathayat, Y. Kim, V. G. Lisnyak, S. L. Maki, V. Nicolaescu, C. A. Taylor, C. Tesar, Y.-A. Zhang, Z. Zhou, G. Randall, K. Michalska, S. A. Snyder, B. C. Dickinson & A. Joachimiak (2021) Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors. *Nature Communications,* 12**,** 1-9.

Osman, A. M., P. J. Den Besten & P. C. M. van Noort (2003) Menadione enhances oxyradical formation in earthworm extracts: vulnerability of earthworms to quinone toxicity. *Aquatic Toxicology,* 65**,** 101-109.

Osterman, I., O. Dontsova & P. Sergiev (2020) rRNA Methylation and Antibiotic Resistance. *Biochemistry. Biokhimiia,* 85.

Ovung, A. & J. Bhattacharyya (2021) Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews,* 13**,** 259-272.

Oyedemi, S., A. Okoh, L. Mabinya, G. Pirochenva & A. Afolayan (2009) The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, A-terpineol and Y-terpinene against Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris and Escherichia coli. *African Journal of Biotechnology,* 8**,** 1280-1286.

O'Neill, J. (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom. 2016. *Landmark report that analysed the impact of antimicrobial resistance from an economic perspective, which is the source of the highly quoted figure that antimicrobial resistance will cause,* 10.

Palaniappan, K. & R. A. Holley (2010) Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology,* 140**,** 164-168.

Pallecchi, L., A. Bartoloni, F. Paradisi & G. M. Rossolini (2008) Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Review of Anti-infective Therapy,* 6**,** 725-732.

Pan, M., C. K. C. Wong & L. M. Chu (2014) Distribution of Antibiotics in Wastewater-Irrigated Soils and Their Accumulation in Vegetable Crops in the Pearl River Delta, Southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 62**,** 11062-11069.

Pan, Y., S.-w. Yan, R.-z. Li, Y.-w. Hu & X.-x. Chang (2017) Lethal/sublethal responses of Daphnia magna to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. *Scientific Reports,* 7**,** 40385.

Panda, S. K., M. Reynders, P. N. Kipanga & W. Luyten (2025) The anti-staphylococcal activity (planktonic and biofilm) of Cnestis ferruginea is due to benzoquinone, the oxidation product of hydroquinone. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* Volume 14 - 2024.

Pandey, D. K., N. Mishra & P. Singh (2005) Relative phytotoxicity of hydroquinone on rice (Oryza sativa L.) and associated aquatic weed green musk chara (Chara zeylanica Willd.). *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 83**,** 82-96.

Pankey, G. & L. Sabath (2025) Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases,* 38**,** 864-870.

Park, S. & K. Choi (2008a) Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology,* 17**,** 526-538.

--- (2008b) Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology,* 17.

Park, S. & S. Oh (2020) Activated sludge-degrading analgesic drug acetaminophen: Acclimation, microbial community dynamics, degradation characteristics, and bioaugmentation potential. *Water Research,* 182**,** 115957.

Paulus, G. K., L. M. Hornstra, N. Alygizakis, J. Slobodnik, N. Thomaidis & G. Medema (2019) The impact of on-site hospital wastewater treatment on the downstream

communal wastewater system in terms of antibiotics and antibiotic resistance genes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health,* 222**,** 635-644.

Payne, D. J., M. N. Gwynn, D. J. Holmes & D. L. Pompliano (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery,* 6**,** 29-40.

Pech-Puch, D., M. Pérez-Povedano, M. Martinez-Guitian, C. Lasarte-Monterrubio, J. C. Vázquez-Ucha, G. Bou, J. Rodríguez, A. Beceiro & C. Jimenez (2020) In Vitro and In Vivo Assessment of the Efficacy of Bromoageliferin, an Alkaloid Isolated from the Sponge Agelas dilatata, against Pseudomonas aeruginosa. *Marine Drugs,* 18.

Pedler Sherwood, B., E. Shaffer, K. Reyes, K. Longnecker & L. Aluwihare (2015) Metabolic characterization of a model bacterial strain capable of significant chemical alteration of marine dissolved organic matter. *Marine Chemistry*.

Pedrinho, A., P. A. Karas, A. Kanellopoulos, E. Feray, I. Korman, G. Wittenberg, O. Ramot & D. G. Karpouzas (2024) The effect of natural products used as pesticides on the soil microbiota: OECD 216 nitrogen transformation test fails to identify effects that were detected via q-PCR microbial abundance measurement. *Pest Management Science,* 80**,** 2563-2576.

Peechakara, B. V., H. Basit & M. Gupta (2023) Ampicillin.

Pei, R., B. J. F Zhou & J. Xu (2009) Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method. *Journal of food science,* 74.

Peleg, M., M. G. Corradini & M. D. Normand (2007) The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Research International,* 40**,** 808-818.

Petrelli, D., F. Buonanno, L. Vitali & C. Ortenzi (2012) Antimicrobial activity of the protozoan toxin climacostol and its derivatives. *Biologia,* 67.

Pino, M. R., J. Val, A. M. Mainar, E. Zuriaga, C. Español & E. Langa (2015) Acute toxicological effects on the earthworm Eisenia fetida of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. *Science of The Total Environment,* 518-519**,** 225-237.

Pino-Otín, M. R., N. Ferrando, D. Ballestero, E. Langa, F. J. Roig & E. M. Terrado (2022a) Impact of eight widely consumed antibiotics on the growth and physiological profile of natural soil microbial communities. *Chemosphere,* 305**,** 135473.

Pino-Otín, M. R., C. Gan, E. Terrado, M. A. Sanz, D. Ballestero & E. Langa (2022b) Antibiotic properties of Satureja montana L. hydrolate in bacteria and fungus of clinical interest and its impact in non-target environmental microorganisms. *Scientific Reports,* 12**,** 18460.

Pino-Otín, M. R., E. Langa, J. Val, A. M. Mainar & D. Ballestero (2021) Impact of citronellol on river and soil environments using non-target model organisms and natural populations. *Journal of Environmental Management,* 287**,** 112303.

Pino-Otín, M. R., G. Lorca, E. Langa, F. Roig, E. M. Terrado & D. Ballestero (2023a) Assessing the Ecotoxicity of Eight Widely Used Antibiotics on River Microbial Communities. *International Journal of Molecular Sciences,* 24.

Pino-Otín, M. R., G. Lorca, J. Val, N. Ferrando, D. Ballestero & E. Langa (2023b) Ecotoxicological Study of Tannic Acid on Soil and Water Non-Target Indicators and Its Impact on Fluvial and Edaphic Communities. *Plants,* 12.

Pino-Otín, M. R., A. Valenzuela, C. Gan, G. Lorca, N. Ferrando, E. Langa & D. Ballestero (2024) Ecotoxicity of five veterinary antibiotics on indicator organisms and water and soil communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 274**,** 116185.

Pogue, J. M., M. N. Dudley, A. Eranki & K. S. Kaye. 2017. 146 - Tetracyclines and Chloramphenicol. In *Infectious Diseases (Fourth Edition),* eds. J. Cohen, W. G. Powderly & S. M. Opal, 1256-1260.e1. Elsevier.

Pohland, B., Owen, B., 2009. A language and environment for statistical computing, 1. R Core Team, pp. 1–3.

Polianciuc, S. I., A. E. Gurzău, B. Kiss, M. G. Ştefan & F. Loghin (2020) Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and Pharmacy Reports,* 93**,** 231.

Pollard, J. E., J. Snarr, V. Chaudhary, J. D. Jennings, H. Shaw, B. Christiansen, J. Wright, W. Jia, R. E. Bishop & P. B. Savage (2012) In vitro evaluation of the potential for resistance development to ceragenin CSA-13. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 67**,** 2665.

Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 56**,** 20-51.

Poudel, A. N., S. Zhu, N. Cooper, P. Little, C. Tarrant, M. Hickman & G. Yao (2023) The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE,* 18**,** e0285170.

Prerna, J. Chadha, L. Khullar, U. Mudgil & K. Harjai (2024) A comprehensive review on the pharmacological prospects of Terpinen-4-ol: From nature to medicine and beyond. *Fitoterapia,* 176**,** 106051.

Proia, L., G. Lupini, V. Osorio, S. Pérez, D. Barceló, T. Schwartz, S. Amalfitano, S. Fazi, A. M. Romaní & S. Sabater (2013) Response of biofilm bacterial communities to antibiotic pollutants in a Mediterranean river. *Chemosphere,* 92**,** 1126-1135.

Pulingam, T., T. Parumasivam, A. M. Gazzali, A. M. Sulaiman, J. Y. Chee, M. Lakshmanan, C. F. Chin & K. Sudesh (2022) Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 170**,** 106103.

Pérez Pantoja, D., R. Donoso, L. Agulló Carvajal, M. Córdova, M. Seeger, D. Pieper & B. Gonzalez (2011) Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environmental microbiology,* 14**,** 1091-117.

Pérez-Flores, J. G., L. García-Curiel, E. Pérez-Escalante, E. Contreras-López, G. Y. Aguilar-Lira, C. Ángel-Jijón, L. G. González-Olivares, E. S. Baena-Santillán, I. O. Ocampo-Salinas, J. A. Guerrero-Solano & L. A. Portillo-Torres (2025) Plant Antimicrobial Compounds and Their Mechanisms of Action on Spoilage and Pathogenic Bacteria: A Bibliometric Study and Literature Review. *Applied Sciences,* 15.

Qiu, J., X. Niu, J. Dong, D. Wang, J. Wang, H. Li, M. Luo, S. Li, H. Feng & X. Deng (2012) Baicalin Protects Mice From Staphylococcus aureus Pneumonia Via Inhibition of the Cytolytic Activity of α-Hemolysin. *The Journal of Infectious Diseases,* 206**,** 292-301.

Qiu, L., T. J. Daniell, S. A. Banwart, M. Nafees, J. Wu, W. Du, Y. Yin & H. Guo (2021) Insights into the mechanism of the interference of sulfadiazine on soil microbial community and function. *Journal of Hazardous Materials,* 419**,** 126388.

Qu, M., Y. Liu, M. Hao, M. Wang, R. Chen, X. C. Wang, Y. Zheng & M. Dzakpasu (2022) Microbial community and carbon–nitrogen metabolism pathways in integrated vertical flow constructed wetlands treating wastewater containing antibiotics. *Bioresource Technology,* 354**,** 127217.

Quaik, S., A. Embrandiri, B. Ravindran, K. Hossain, N. A. Al-Dhabi, M. V. Arasu, S. Ignacimuthu & N. Ismail (2020) Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries. *Journal of King Saud University - Science,* 32**,** 1300-1305.

Raabe Vanessa, N. & L. Shane Andi (2019) Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae). *Microbiology Spectrum,* 7**,** 10.1128/microbiolspec.gpp3-0007-2018.

Radl, V., R. kindler, G. Welzl, A. Albert, B.-M. Wilke, W. Amelung & M. Schloter (2015) Drying and rewetting events change the response pattern of nitrifiers but not of denitrifiers to the application of manure containing antibiotic in soil. *Applied Soil Ecology,* 95**,** 99-106.

Radtke, A. L., A. J. Quayle & M. M. Herbst-Kralovetz (2012) Microbial Products Alter the Expression of Membrane-Associated Mucin and Antimicrobial Peptides in a Three-Dimensional Human Endocervical Epithelial Cell Model1. *Biology of Reproduction,* 87**,** 132, 1-10.

Ragnini, G. M. S., V. Schvinn Júnior & L. Zanotto (2022) Rational use of antibiotics – A narrative review. *Research, Society and Development,* 11**,** e92111435999.

Ramirez, J., F. Guarner, L. Bustos Fernandez, A. Maruy, V. L. Sdepanian & H. Cohen (2020) Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 10.

Ramirez, M. S. & M. E. Tolmasky (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates,* 13**,** 151-171.

Ranjan, N. & D. P. Arya (2023) Parallel G-quadruplex recognition by neomycin. *Frontiers in Chemistry,* Volume 11 - 2023.

Rees, E. M., A. Minter, W. J. Edmunds, C. L. Lau, A. J. Kucharski & R. Lowe (2021) Transmission modelling of environmentally persistent zoonotic diseases: a systematic review. *The Lancet Planetary Health,* 5**,** e466-e478.

Reggiani, R. & P. Laoreti (2000) Evidence for the involvement of phospholipase C in the anaerobic signal transduction. *Plant and cell physiology,* 41**,** 1392-1396.

Resiniques, L. D. 2022. Safety data sheet terpineol.

Reynolds, D. & M. Kollef (2021) The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update. *Drugs,* 81**,** 2117-2131.

Rhouma, M., J.-Y. Madec & R. Laxminarayan (2023) Colistin: from the shadows to a One Health approach for addressing antimicrobial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 61**,** 106713.

Rider, C. V. & G. A. LeBlanc (2005) An Integrated Addition and Interaction Model for Assessing Toxicity of Chemical Mixtures. *Toxicological Sciences,* 87**,** 520-528.

Rios-Miguel, A. B., G. J. Smith, G. Cremers, T. van Alen, M. S. M. Jetten, H. J. M. Op den Camp & C. U. Welte (2022) Microbial paracetamol degradation involves a high diversity of novel amidase enzyme candidates. *Water Research X,* 16**,** 100152.

Roberts, M. C. & S. Schwarz (2016) Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *Journal of Environmental Quality,* 45**,** 576-592.

Rodríguez-González, L., A. Núñez-Delgado, E. Álvarez-Rodríguez, M. Díaz-Raviña, M. Arias-Estévez, D. Fernández-Calviño & V. Santás-Miguel (2023) Direct toxicity of six antibiotics on soil bacterial communities affected by the addition of bio-adsorbents. *Environmental Pollution,* 322**,** 121161.

Rogowska-van der Molen, M. A., A. Berasategui-Lopez, S. Coolen, R. S. Jansen & C. U. Welte (2023) Microbial degradation of plant toxins. *Environmental Microbiology,* 25**,** 2988-3010.

Rojo-Bezares, B., J. M. Azcona-GutiÉRrez, C. Martin, M. S. JareÑO, C. Torres & Y. SÁEnz (2016) Streptococcus agalactiae from pregnant women: antibiotic and heavy-metal resistance mechanisms and molecular typing. *Epidemiology and Infection,* 144**,** 3205-3214.

Rosal, R., M. S. Gonzalo, K. Boltes, P. Letón, J. J. Vaquero & E. García-Calvo (2009) Identification of intermediates and assessment of ecotoxicity in the oxidation products generated during the ozonation of clofibric acid. *Journal of Hazardous Materials,* 172**,** 1061-1068.

Rosal, R., I. Rodea-Palomares, K. Boltes, F. Fernandez-Piñas, F. Leganes & A. Petre (2010) Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. *Chemosphere,* 81**,** 288-93.

Rosato, A., C. Vitali, N. De Laurentis, D. Armenise & M. Antonietta Milillo (2007) Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine,* 14**,** 727-732.

Rothwell, J., A. Day & M. Morgan (2005) Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry,* 53.

Rungelrath, V. & F. R. DeLeo (2020) Staphylococcus aureus, Antibiotic Resistance, and the Interaction with Human Neutrophils. *Antioxidants & Redox Signaling,* 34**,** 452-470.

Sacristán-Soriano, O., B. Banaigs & M. A. Becerro (2012) Temporal Trends in the Secondary Metabolite Production of the Sponge Aplysina aerophoba. *Marine Drugs,* 10**,** 677-693.

Sahu, U. & P. Khare. 2023. Chapter 16 - Antibiotics: action mechanism and modern challenges. In *Advanced Microbial Techniques in Agriculture, Environment, and Health Management,* eds. S. Chandra Pandey, V. Pande, D. Sati & M. Samant, 281-292. Academic Press.

Said, M., E. Tirthani & E. Lesho (2024) Enterococcus Infections.

Salam, M. A., M. Y. Al-Amin, J. S. Pawar, N. Akhter & I. B. Lucy (2023a) Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 30**,** 103582.

Salam, M. A., M. Y. Al-Amin, M. T. Salam, J. S. Pawar, N. Akhter, A. A. Rabaan & M. A. A. Alqumber (2023b) Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare,* 11.

Salehi, B., P. V. T. Fokou, M. Sharifi-Rad, P. Zucca, R. Pezzani, N. Martins & J. Sharifi-Rad (2019) The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals,* 12**,** 11.

Saloni Dattani, Lucas Rodés-Guirao, Hannah Ritchie, Esteban Ortiz-Ospina and Max Roser (2023) - "Life Expectancy" Published online at OurWorldinData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/life-expectancy' [Online Resource]

Samreen, I. Ahmad, H. A. Malak & H. H. Abulreesh (2021) Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance,* 27**,** 101-111.

Santos, A., P. Yustos, A. Quintanilla, F. García-Ochoa, J. A. Casas & J. J. Rodríguez (2004) Evolution of Toxicity upon Wet Catalytic Oxidation of Phenol. *Environmental Science & Technology,* 38**,** 133-138.

Santás-Miguel, V., L. Rodríguez-González, A. Núñez-Delgado, M. Díaz-Raviña, M. Arias-Estévez & D. Fernández-Calviño (2020) The Toxicity Exerted by the Antibiotic Sulfadiazine on the Growth of Soil Bacterial Communities May Increase over Time. *International Journal of Environmental Research and Public Health,* 17.

Sathiyamoorthi, E., O. S. Faleye, J.-H. Lee & J. Lee (2023) Hydroquinone derivatives attenuate biofilm formation and virulence factor production in Vibrio spp. *International Journal of Food Microbiology,* 384**,** 109954.

Savoia, D., C. Avanzini, T. Allice, E. Callone, G. Guella & F. Dini (2004) Antimicrobial Activity of Euplotin C, the Sesquiterpene Taxonomic Marker from the Marine Ciliate Euplotes crassus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 48**,** 3828-3833.

Saxena, P. N., S. K. Gupta & R. C. Murthy (2014) Comparative toxicity of carbaryl, carbofuran, cypermethrin and fenvalerate in Metaphire posthuma and Eisenia fetida —A possible mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 100**,** 218-225.

Schaft, N., J. Dörrie, G. Schuler, B. Schuler-Thurner, H. Sallam, S. Klein, G. Eisenberg, S. Frankenburg, M. Lotem & A. Khatib (2023) The future of affordable cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology,* 14.

Schlech Walter, F. (2019) Epidemiology and Clinical Manifestations of Listeria monocytogenes Infection. *Microbiology Spectrum,* 7**,** 10.1128/microbiolspec.gpp3-0014-2018.

Schoffelen, N. J., W. Mohr, T. G. Ferdelman, J. Duerschlag, S. Littmann, H. Ploug & M. M. M. Kuypers (2019) Phosphate availability affects fixed nitrogen transfer from diazotrophs to their epibionts. *The ISME Journal,* 13**,** 2701-2713.

Scholar, E. 2007. Sulfadiazine. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference,* eds. S. J. Enna & D. B. Bylund, 1-5. New York: Elsevier.

Schwarz, S., C. Kehrenberg, B. Doublet & A. Cloeckaert (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews,* 28**,** 519-542.

Sen, D. & P. Mukhopadhyay (2024) Antimicrobial resistance (AMR) management using CRISPR-Cas based genome editing. *Gene and Genome Editing,* 7**,** 100031.

Septer Alecia, N. & L. Visick Karen (2024) Lighting the way: how the Vibrio fischeri model microbe reveals the complexity of Earth's "simplest" life forms. *Journal of Bacteriology,* 206**,** e00035-24.

Serwecińska, L. (2020) Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health. *Water,* 12.

Settimo, L., K. Bellman & R. Knegtel (2014) Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds. *Pharmaceutical research,* 31.

Sharma, P. & A. Towse (2011) New Drugs to Tackle Antimicrobial Resistance: Analysis of EU Policy Options - OHE.

Sharma, R., R. Rao, S. Kumar, S. Mahant & S. Khatkar (2019) Therapeutic Potential of Citronella Essential Oil: A Review. *Current drug discovery technologies,* 16.

Shettel, N. L. & N. E. Balke (1983) Plant Growth Response to Several Allelopathic Chemicals. *Weed Science,* 31**,** 293-298.

Shi, Z., J. Zhang, L. Tian, L. Xin, C. Liang, X. Ren & M. Li (2023) A Comprehensive Overview of the Antibiotics Approved in the Last Two Decades: Retrospects and Prospects. Molecules, 28.

Shutter, M. C. & H. Akhondi (2023) Tetracycline.

Sigurnjak Bureš, M., M. Cvetnić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, M. Markić, H. Kušić, T. Bolanča, M. Rogošić & Š. Ukić (2021) Modeling the toxicity of pollutants mixtures for risk assessment: a review. *Environmental Chemistry Letters,* 19**,** 1629-1655.

Sijbom, M., F. L. Büchner, N. H. Saadah, M. E. Numans & M. G. J. de Boer (2023) Determinants of inappropriate antibiotic prescription in primary care in developed countries with general practitioners as gatekeepers: a systematic review and construction of a framework. *BMJ Open,* 13**,** e065006.

Sikkema, J., J. A. de Bont & B. Poolman (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry,* 269**,** 8022-8028.

Silva, R. C., J. S. d. Costa, R. O. d. Figueiredo, W. N. Setzer, J. K. R. d. Silva, J. G. S. Maia & P. L. B. Figueiredo (2021) Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from Psidium Species and Their Biological Properties. *Molecules,* 26.

Sim, J. X. F., M. Khazandi, W. Y. Chan, D. J. Trott & P. Deo (2019) Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology,* 30**,** 524-e159.

Simone, R. & R. Popino (2006) The stability of neomycin in several pharmaceutical preparations. *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association,* 44**,** 275-80.

Simsek, M. & R. Duman (2017) Investigation of Effect of 1,8-cineole on Antimicrobial Activity of Chlorhexidine Gluconate. *Pharmacognosy Research,* 9**,** 234.

Simões, M., R. N. Bennett & E. A. S. Rosa (2009) Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports,* 26**,** 746-757.

Singh, M., S. Wang, H. Joo, Z. Ye, K. M. Christison, R. Hekman, C. Vierra & L. Xue (2020) Use of neomycin as a structured amino-containing side chain motif for phenanthroline-based G-quadruplex ligands and telomerase inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design,* 96**,** 1292-1304.

Singh, R., M. A. M. Shushni & A. Belkheir (2015) Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arabian Journal of Chemistry,* 8**,** 322-328.

Sladkova, S. V. & S. V. Kholodkevich (2011) Total protein in hemolymph of crawfish Pontastacus leptodactylus as a parameter of the functional state of animals and a biomarker of quality of habitat. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology,* 47**,** 160-167.

Smith, W. P. J., B. R. Wucher, C. D. Nadell & K. R. Foster (2023) Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology,* 21**,** 519-534.

Solanki, S. & H. Kumar Das (2024) Antimicrobial resistance: Molecular drivers and underlying mechanisms. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health,* 3**,** 100122.

Solís, Y., G. Chavarría, F. García & C. Rodríguez (2011) Exposure of a Tropical Soil to MG/KG of Oxytetracycline Elicits Hormetic Responses in the Catabolic Activities of Its Microbial Community. *Dose-Response,* 9**,** 434.

Song, C., C. Zhang, L. Fan, L. Qiu, W. Wu, S. Meng, G. Hu, B. Kamira & J. Chen (2016) Occurrence of antibiotics and their impacts to primary productivity in fishponds around Tai Lake, China. *Chemosphere,* 161**,** 127-135.

Spadini, C., I. Mattia, C. H. A. Maria, M. S. Lucia, M. Nicolò, S. Marica, B. Simone, R. Federico & C. S. and Cabassi (2024) Stability of the antimicrobial activity of selected essential oils and nature identical compounds and their interaction with Tween 20 against reference bacterial strains of zootechnical interest. *Italian Journal of Animal Science,* 23**,** 189-199.

Spain, A. M., L. R. Krumholz & M. S. Elshahed (2009) Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *The ISME Journal,* 3**,** 992-1000.

Spain Jim, C. & T. Gibson David (1991) Pathway for Biodegradation of p-Nitrophenol in a Moraxella sp. *Applied and Environmental Microbiology,* 57**,** 812-819.

Srain, H. S., K. F. Beazley & T. R. Walker (2020) Pharmaceuticals and personal care products and their sublethal and lethal effects in aquatic organisms. *Environmental Reviews,* 29**,** 142-181.

Srisukh, V., C. Tribuddharat, V. Nukoolkarn, N. Bunyapraphatsara, K. Chokephaibulkit, S. Phoomniyom, S. Chuanphung & S. Srifuengfung (2012) Antibacterial activity of essential oils from Citrus hystrix (makrut lime) against respiratory tract pathogens. *Scienceasia***,** 212-217.

Staley, C., T. J. Gould, P. Wang, J. Phillips, J. B. Cotner & M. J. Sadowsky (2015) Species sorting and seasonal dynamics primarily shape bacterial communities in the Upper Mississippi River. *Science of The Total Environment,* 505**,** 435-445.

Stan, D., A.-M. Enciu, A. L. Mateescu, A. C. Ion, A. C. Brezeanu, D. Stan & C. Tanase (2021) Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation. *Frontiers in Pharmacology,* 12.

Stanton, I. C., A. Bethel, A. F. C. Leonard, W. H. Gaze & R. Garside (2022) Existing evidence on antibiotic resistance exposure and transmission to humans from the environment: a systematic map. *Environmental Evidence,* 11**,** 8.

Stephen, J., F. Salam, M. Lekshmi, S. H. Kumar & M. F. Varela (2023) The Major Facilitator Superfamily and Antimicrobial Resistance Efflux Pumps of the ESKAPEE Pathogen Staphylococcus aureus. *Antibiotics,* 12.

Sturini, M., A. Speltini, F. Maraschi, L. Pretali, A. Profumo, E. Fasani, A. Albini, R. Migliavacca & E. Nucleo (2012) Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. *Water Research,* 46**,** 5575-5582.

Su, D., W. Ben, B. W. Strobel & Z. Qiang (2020) Occurrence, source estimation and risk assessment of pharmaceuticals in the Chaobai River characterized by adjacent land use. *Science of The Total Environment,* 712**,** 134525.

Suga, N., M. Ogo & S. Suzuki (2013) Risk assessment of oxytetracycline in water phase to major sediment bacterial community: A water-sediment microcosm study. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 36**,** 142-148.

Suganya, T., I. A. S. V. Packiavathy, G. S. B. Aseervatham, A. Carmona, V. Rashmi, S. Mariappan, N. R. Devi & D. A. Ananth (2022) Tackling Multiple-Drug-Resistant Bacteria With Conventional and Complex Phytochemicals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 12.

Sun, F.-L., Y.-S. Wang, M.-L. Wu & C.-C. Sun (2017) Cyanobacterial community diversity in the sediments of the Pearl River Estuary in China. *Scientia Marina,* 81**,** 477-485.

Sun, L., N. Meng, H. Wang, Z. Wang, X. Jiao & J. Wang (2024) Occurrence and characteristics of blaOXA-181-carrying Klebsiella aerogenes from swine in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance,* 38**,** 35-41.

Suresh, S., V. C. Srivastava & I. M. Mishra (2012) Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review. *International Journal of Energy and Environmental Engineering,* 3**,** 1-19.

Suthar, S., S. Singh & S. Dhawan (2008) Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category? *Ecological Engineering,* 32**,** 99-107.

Sönmez, V. & N. Sivri (2020) The Toxic Effects of Commonly Used Antibiotics in Turkey on Aquatic Organisms. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences,* 5**,** 154-160.

Tacias-Pascacio, V., D. Castañeda-Valbuena, R. Morellon-Sterling, O. Tavano & ABerenguer-Murcia (2021) Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. *International journal of biological macromolecules,* 184.

Tahrani, L., J. Van Loco, H. Ben Mansour & T. Reyns (2016) Occurrence of antibiotics in pharmaceutical industrial wastewater, wastewater treatment plant and sea waters in Tunisia. *Journal of water and health,* 14**,** 208-213.

Tamba, M., R. Rocca, A. Prosperi, G. Pupillo, P. Bassi, G. Galletti, E. Martini, A. Santi, G. Casadei & N. Arrigoni (2022) Evaluation of Control Program Against Streptococcus agalactiae Infection in Dairy Herds During 2019–2021 in Emilia-Romagna Region, Northern Italy. *Frontiers in Veterinary Science,* Volume 9 - 2022.

Tan, S., D. Li & X. Zhu (2020) Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 124**,** 109821.

Tavares-Carreon, F., K. De Anda-Mora, I. C. Rojas-Barrera & A. Andrade (2023) Serratia marcescens antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ,* 11**,** e14399.

Techer, D., P. Fontaine, A. Personne, S. Viot & M. Thomas (2016) Allelopathic potential and ecotoxicity evaluation of gallic and nonanoic acids to prevent cyanobacterial growth in lentic systems: A preliminary mesocosm study. *Science of The Total Environment,* 547**,** 157-165.

Teijaro, C. N., A. Adhikari & B. Shen (2019) Challenges and opportunities for natural product discovery, production, and engineering in native producers versus heterologous hosts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 46**,** 433-444.

Teodorović, I., I. Planojevic, P. Knezevic, S. Radak & I. Nemet (2009) Sensitivity of bacterial vs. acute Daphnia magna toxicity tests to metals. *Central European Journal of Biology,* 4**,** 482-492.

Thanassi, D. G., G. S. Suh & H. Nikaido (1995) Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology,* 177**,** 998-1007.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 15.0, 2025. http://www.eucast.org.

Theophel, K., V. J. Schacht, M. Schlüter, S. Schnell, C.-S. Stingu, R. Schaumann & M. Bunge (2014) The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology,* Volume 5 - 2014.

Theuretzbacher, U., K. Bush, S. Harbarth, M. Paul, J. H. Rex, E. Tacconelli & G. E. Thwaites (2020) Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. *Nature Reviews Microbiology,* 18**,** 286-298.

Tian, H., X. Xu, J. Qu, H. Li, Y. Hu, L. Huang, W. He & B. Li (2020) Biodegradation of phenolic compounds in high saline wastewater by biofilms adhering on aerated membranes. *Journal of Hazardous Materials,* 392**,** 122463.

Tian, Z., A. Yao, X. Luo, L. Chen & J. Tang (2025) Establishment of rapid propagation system of high-essential-oil Melaleuca alternifolia and characteristics of soil microorganisms during plantlet transitioning from aseptic to microorganism conditions. 230**,** 121135.

Timung, R., C. R. Barik, S. Purohit & V. V. Goud (2016) Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. *Industrial Crops and Products,* 94**,** 178-188.

Tissot, A., P. Boule, S. Lambert, J. Lemaire & J.-C. Palla (1985) Photochimie et environnement X- evaluation de la toxicite des produits de phototransformation

de l'hydroquinone et des chlorophenols en milieu aqueux. *Chemosphere,* 14**,** 1221-1230.

Tiwari, A., R. Dhanker, A. Saxena, S. Goyal, E. M. Melchor-Martínez, H. M. N. Iqbal & R. Parra-Saldívar (2021) Toxicity evaluation of personal care and household products as silent killers on the survival of Daphnia magna. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering,* 4**,** 100124.

Tkaczyk, A., A. Bownik, J. Dudka, K. Kowal & B. Ślaska (2021) Daphnia magna model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of The Total Environment,* 763**,** 143038.

Tokano, M., N. Tarumoto, K. Imai, J. Sakai, T. Maeda, T. Kawamura, K. Seo, K. Takahashi, T. Yamamoto & S. Maesaki (2023) Bacterial Meningitis Caused by Bacillus subtilis var. natto. *Internal Medicine,* 62**,** 1989-1993.

Tong Steven, Y. C., S. Davis Joshua, E. Eichenberger, L. Holland Thomas & G. Fowler Vance (2015) Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews,* 28**,** 603-661.

Traversi, D., S. Villa, E. Lorenzi, R. Degan & G. Gilli (2012) Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *Journal of Environmental Management,* 111**,** 173-177.

Trif, E., C. Cerbu, D. Olah, S. D. Zăblău, M. Spînu, A. V. Potârniche, E. Pall & F. Brudașcă (2023) Old Antibiotics Can Learn New Ways: A Systematic Review of Florfenicol Use in Veterinary Medicine and Future Perspectives Using Nanotechnology. *Animals,* 13**,** 1695.

Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani & C. Daniele (2005) Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 49**,** 2474.

Trujillo-Reyes, Á., A. Pérez, S. Cuéllar, A. Serrano, J. Cubero, D. Jeison & F. G. Fermoso (2024) Evaluation of toxic effect of monoterpene compounds on anaerobic digestion. *Journal of Environmental Chemical Engineering,* 12**,** 112035.

Tsui, C., E. F. Kong & M. A. Jabra-Rizk (2016) Pathogenesis of Candida albicans biofilm. *Pathogens and Disease,* 74**,** ftw018.

Turkay, O., S. Barışçı, H. Öztürk, B. Öztürk & G. Şeker Mine (2018) Toxicological Profile of 1,4-Benzoquinone and Its Degradation By-Products during Electro-Fenton, Electrocoagulation, and Electrosynthesized Fe(VI) Oxidation. *Journal of Environmental Engineering,* 144**,** 04018124.

Uddin, M., J. Chen, X. Qiao, R. Tian, Y. Arafat & X. Yang (2019) Bacterial community variations in paddy soils induced by application of veterinary antibiotics in plant-soil systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 167**,** 44-53.

UNE-EN ISO 6341; Water Quality—Determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera Crustacea)—Acute Toxicity Test. AENOR: Madrid, Spain, 2012.

UNE-EN ISO 11348; Water Quality—Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of A. fischeri (Luminescent Bacteria Test). International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.

Usary, J. & W. Champney (2001) Erythromycin inhibition of 50S ribosomal subunit formation in Escherichia coli cells. *Molecular microbiology,* 40.

Uçar, K. & Z. Göktaş (2023) Biological activities of naringenin: A narrative review based on in vitro and in vivo studies. *Nutrition Research,* 119**,** 43-55.

Valgas, C., S. M. d. Souza, E. F. A. Smânia & A. Smânia Jr (2007) Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology,* 38.

Van Boeckel, T. P., C. Brower, M. Gilbert, B. T. Grenfell, S. A. Levin, T. P. Robinson, A. Teillant & R. Laxminarayan (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 112**,** 5649-5654.

Van Boeckel, T. P., J. Pires, R. Silvester, C. Zhao, J. Song, N. G. Criscuolo, M. Gilbert, S. Bonhoeffer & R. Laxminarayan (2019) Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science,* 365**,** eaaw1944.

Van, T. T. H., Z. Yidana, P. M. Smooker & P. J. Coloe (2020) Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses. *Journal of Global Antimicrobial Resistance,* 20**,** 170-177.

Vaou, N., E. Stavropoulou, C. Voidarou, C. Tsigalou & E. Bezirtzoglou (2021) Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms,* 9.

Vattem, D. A., Y. T. Lin, R. Ghaedian & K. Shetty (2005) Cranberry synergies for dietary management of Helicobacter pylori infections. *Process Biochemistry,* 40**,** 1583-1592.

Vega-Gálvez, A., K. Stucken, C. Cantuarias, F. Lamas, V. García & A. Pastén (2021) Antimicrobial properties of papaya (Vasconcellea pubescens) subjected to low-temperature vacuum dehydration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 67**,** 102563.

Veirup, N. & C. Kyriakopoulos (2023) Neomycin.

Venancio, A. N., M. J. Silva, L. A. Parreira, A. A. Júlio, G. R. Souza, M. F. C. Santos & L. Menini (2024) Citronellal: a natural aldehyde with important properties.

Venkateswaran, P., S. Vasudevan, H. David, A. Shaktivel, K. Shanmugam, P. Neelakantan & A. P. Solomon (2023) Revisiting ESKAPE Pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 13.

Ventola, L. (2015) The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics,* 40**,** 277.

Vigil, A. L.-M., E. Palou, M. E. Parish & P. M. Davidson (2005) 21 Methods for Activity Assay and Evaluation of Results. *ANTIMICROBIALS IN FOOD***,** 659.

Vila, J., E. Sáez-López, J. R. Johnson, U. Römling, U. Dobrindt, R. Cantón, C. G. Giske, T. Naas, A. Carattoli, M. Martínez-Medina, J. Bosch, P. Retamar, J. Rodríguez-Baño, F. Baquero & S. M. Soto (2016) Escherichia coli: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews,* 40**,** 437-463.

Villa, S., M. Vighi & A. Finizio (2014) Experimental and predicted acute toxicity of antibacterial compounds and their mixtures using the luminescent bacterium Vibrio fischeri. *Chemosphere,* 108**,** 239-244.

Virolle, C., K. Goldlust, S. Djermoun, S. Bigot & C. Lesterlin (2020) Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes,* 11.

Vollmannová, A., T. Bojňanská, J. Musilová, J. Lidiková & M. Cifrová (2024) Quercetin as one of the most abundant represented biological valuable plant components with remarkable chemoprotective effects - A review. *Heliyon,* 10**,** e33342.

von Wintersdorff, C. J. H., J. Penders, J. M. van Niekerk, N. D. Mills, S. Majumder, L. B. van Alphen, P. H. M. Savelkoul & P. F. G. Wolffs (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology,* 7.

Vázquez-López, R., S. G. Solano-Gálvez, J. J. Juárez Vignon-Whaley, J. A. Abello Vaamonde, L. A. Padró Alonzo, A. Rivera Reséndiz, M. Muleiro Álvarez, E. N. Vega López, G. Franyuti-Kelly, D. A. Álvarez-Hernández, V. Moncaleano Guzmán, J. E. Juárez Bañuelos, J. Marcos Felix, J. A. González Barrios & T. Barrientos Fortes (2020) Acinetobacter baumannii Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics,* 9.

Walsh, T. R. & Y. Wu (2016) China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet Infectious Diseases,* 16**,** 1102-1103.

Wanda, C. R. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology,* 4**,** 482-501.

Wang, C.-Y., Y.-W. Chen & C.-Y. Hou (2019a) Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. *International Journal of Food Properties,* 22**,** 230-238.

Wang, G., J.-M. Brunel, M. Preusse, N. Mozaheb, S. D. Willger, G. Larrouy-Maumus, P. Baatsen, S. Häussler, J.-M. Bolla & F. V. Bambeke (2022a) The membrane-active polyaminoisoprenyl compound NV716 re-sensitizes Pseudomonas aeruginosa to antibiotics and reduces bacterial virulence. *Communications Biology,* 5**,** 871.

Wang, G., Y. Wang, L. Yao, W. Gu, S. Zhao & Z. Shen (2022b) Pharmacological Activity of Quercetin: An Updated Review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM***,** 3997190.

Wang, H., Z. Cheng, L. D. W. Djouonkep, L. Wang, S. Cai & M. Gauthier (2023a) Synthesis and properties of biodegradable aliphatic–aromatic polyesters derived from 4-hydroxybenzaldehyde. *Journal of Applied Polymer Science,* 140**,** e54063.

Wang, J., D. L. Cooper, W. Zhan, D. Wu, H. He, S. Sun, S. T. Lovett & B. Xu (2019b) Diglycine Enables Rapid Intrabacterial Hydrolysis for Activating Anbiotics against Gram-negative Bacteria. *Angewandte Chemie International Edition,* 58**,** 10631-10634.

Wang, J. & J. Z. Han (2008) Effects of heavy metals and antibiotics on soil and vegetables. *Journal of Ecology and Rural Environment,* 24**,** 90-93.

Wang, L., J. Wang, K. Zhang, J. Zhang, D. Cui, J. Wang, P. Ji, Y. Wei & J. Li (2025) Linalool as a potential agent for inhibiting Escherichia coli biofilm formation and exopolysaccharide production. *BMC Veterinary Research,* 21**,** 235.

Wang, M., J. Wu, T. Zhou, Y. Liang, L. Zheng & Y. Sun (2021) Effects of copper and florfenicol on nirS- and nirK-type denitrifier communities and related antibiotic resistance in vegetable soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 213**,** 112011.

Wang, S., H. Wang, B. Ren, H. Li, M. Weir, X. Zhou, T. Oates, L. Cheng & H. Xu (2017) Do quaternary ammonium monomers induce drug resistance in cariogenic, endodontic and periodontal bacterial species? *Dental Materials,* 33.

Wang, W., Y. Weng, T. Luo, Q. Wang, G. Yang & Y. Jin (2023b) Antimicrobial and the Resistances in the Environment: Ecological and Health Risks, Influencing Factors, and Mitigation Strategies. *Toxics,* 11.

Wang, X. J., Y. J. Wang, J. W. Nian, S. W. Liu, Y. H. Zhang, Y. S. Xia, F. Wang, L. F. Wang, R. R. Liu & X. L. Liao (2022c) Accumulation and distribution of oxytetracycline and chlortetracycline in tobacco seedlings and their effects on growth. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences,* 32.

Wang, Y., L. Liu, J. Yang, Y. Duan, Y. Luo, M. J. Taherzadeh, Y. Li, H. Li, M. K. Awasthi & Z. Zhao (2020a) The diversity of microbial community and function varied in response to different agricultural residues composting. *Science of The Total Environment,* 715**,** 136983.

Wang, Z., S. Han, M. Cai, P. Du, Z. Zhang & X. Li (2020b) Environmental behavior of methamphetamine and ketamine in aquatic ecosystem: Degradation, bioaccumulation, distribution, and associated shift in toxicity and bacterial community. *Water Research,* 174**,** 115585.

Wareth, G., H. Neubauer & L. D. Sprague (2019) Acinetobacter baumannii – a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. *Veterinary Research Communications,* 43**,** 1-6.

Waters, M. & P. Tadi (2023) Streptomycin.

Weaver, J. H. & H. P. R. Frederikse (1977) Crc handbook of chemistry and physics. *CRC Press, Boca Raton,* 76**,** 12-156.

Welfare, E. P. o. A. H. a., S. S. Nielsen, D. J. Bicout, P. Calistri, E. Canali, J. A. Drewe, B. Garin-Bastuji, J. L. Gonzales Rojas, C. Gortázar, M. Herskin, V. Michel, M. Á. Miranda Chueca, B. Padalino, P. Pasquali, H. C. Roberts, H. Spoolder, K. Ståhl, A. Velarde, A. Viltrop, C. Winckler, F. Baldinelli, A. Broglia, L. Kohnle & J. Alvarez (2022) Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): antimicrobial-resistant Escherichia coli in dogs and cats, horses, swine, poultry, cattle, sheep and goats. *EFSA Journal,* 20**,** e07311.

Wells, J. R. (2005) Gas-Phase Chemistry of α-Terpineol with Ozone and OH Radical: Rate Constants and Products. *Environmental Science & Technology,* 39**,** 6937-6943.

Wells, N., V.-K. Nguyen & S. Harbarth (2024) Novel insights from financial analysis of the failure to commercialise plazomicin: Implications for the antibiotic investment ecosystem. *Humanities and Social Sciences Communications,* 11**,** 941.

Westman, C. A. 1949. The Effect Hydroquinone on Mitosis in Allium cepa. Fordham University.

Westphal-Settele, K., S. Konradi, F. Balzer, J. Schönfeld & R. Schmithausen (2018) Die Umwelt als Reservoir für Antibiotikaresistenzen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz,* 61**,** 533-542.

Westra, E. R. & B. R. Levin (2020) It is unclear how important CRISPR-Cas systems are for protecting natural populations of bacteria against infections by mobile genetic elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 117**,** 27777-27785.

White, P. A., H. W. Stokes, K. L. Bunny & R. M. Hall (1999) Characterisation of a chloramphenicol acetyltransferase determinant found in the chromosome of Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiology Letters,* 175**,** 27-35.

White, R. L., D. S. Burgess, M. Manduru & J. A. Bosso (1996) Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 40**,** 1914-1918.

WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024.

Wilcox Sheri, K., S. Cavey Gregory & D. Pearson James (2001) Single Ribosomal Protein Mutations in Antibiotic-Resistant Bacteria Analyzed by Mass Spectrometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 45**,** 3046-3055.

William, M. & A. Cesar (2024) ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nature Reviews Microbiology,* 22**,** 598-616.

Wilson, G. B. (1950) CYTOLOGICAL EFFECTS OF SOME ANTIBIOTICS. *Journal of Heredity,* 41**,** 227-231.

Wińska, K., W. Mączka, J. Łyczko, M. Grabarczyk, A. Czubaszek & A. Szumny (2019) Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules,* 24.

Wollenberger, L., B. Halling-Sørensen & K. O. Kusk (2000) Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna. *Chemosphere,* 40**,** 723-730.

Wong, N. R., X. Liu, H. Lloyd, A. M. Colthart, A. E. Ferrazzoli, D. L. Cooper, Y. Zhuang, P. Esquea, J. Futcher, T. M. Pochapsky, J. M. Matthews & T. C. Pochapsky (2018) A new approach to understanding structure-function relationships in cytochromes P450 by targeting terpene metabolism in the wild. *Journal of Inorganic Biochemistry,* 188**,** 96-101.

Wright, G. D. (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology,* 13**,** 589-594.

Wright, S. J., P. Caunt, D. Carter & P. B. Baker (1986) Microbial oxidation of alpha-pinene by Serratia marcescens. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 23**,** 224-227.

Wu, C., X. Zhang, J. Liang, Q. Li, H. Lin, C. Lin, H. Liu, D. Zhou, W. Lu, Z. Sun, X. Lin, H. Zhang, K. Li, T. Xu, Q. Bao & J. Lu (2021) Characterization of florfenicol resistance genes in the coagulase-negative Staphylococcus (CoNS) isolates and genomic features of a multidrug-resistant Staphylococcus lentus strain H29. *Antimicrobial Resistance & Infection Control,* 10**,** 9.

Wu, X., Y. Wang, Y. Zhu, H. Tian, X. Qin, C. Cui, L. Zhao, P. Simonet & X. Zhang (2019) Variability in the Response of Bacterial Community Assembly to Environmental Selection and Biotic Factors Depends on the Immigrated Bacteria, as Revealed by a Soil Microcosm Experiment. *mSystems,* 4**,** 10.1128/msystems.00496-19.

Xavier, S. P., A. Victor, G. Cumaquela, M. D. Vasco & O. A. S. Rodrigues (2022) Inappropriate use of antibiotics and its predictors in pediatric patients admitted at the Central Hospital of Nampula, Mozambique. *Antimicrobial Resistance & Infection Control,* 11**,** 79.

Xia, N., X. Xia, B. Zhu, S. Zheng & J. Zhuang (2013) Bacterial diversity and community structure in the sediment of the middle and lower reaches of the Yellow River, the largest turbid river in the world. *Aquatic microbial ecology,* 71**,** 43-55.

Xiao, R., D. Huang, L. Du, B. Song, L. Yin, Y. Chen, L. Gao, R. Li, H. Huang & G. Zeng (2023) Antibiotic resistance in soil-plant systems: A review of the source, dissemination, influence factors, and potential exposure risks. *Science of The Total Environment,* 869**,** 161855.

Xie, X., Q. Zhou, Z. He & Y. Bao (2010) Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (Triticum aestivum L.). *Environmental Toxicology and Chemistry,* 29**,** 922-928.

Xing, X., X. Li, W. Zhang & Y. Qin (2022) Essential Oil from Hedyotis chrysotricha: Chemical Composition, Cytotoxic, Antibacterial Properties and Synergistic Effects with Streptomycin. *Records of Natural Products*.

Xu, Y., W. Yu, Q. Ma, J. Wang, H. Zhou & C. Jiang (2016) The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 134**,** 43-52.

Yang, J.-F., G.-G. Ying, J.-L. Zhao, R. Tao, H.-C. Su & F. Chen (2010) Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. *Science of The Total Environment,* 408**,** 3424-3432.

Yang, Q., W. Huang, X. Yan, Q. Ding, J. Liu, B. Cheng & T. Duan (2025) Efficient degradation of neomycin by Bacillus velezensis and Cupriavidus basilensis isolated from mangrove soil and pharmaceutical wastewater. *Frontiers in Microbiology,* Volume 16 - 2025.

Yang, S., C. Lu, C. Qin, C. Lu, Z. Pan, L. Zhao, M. Bai, X. Li, Y. Sun, L. Weng & Y. Li (2023a) Mitigation effects and microbial mechanism of two ecological earthworms on the uptake of chlortetracycline and antibiotic resistance genes in lettuce. *Science of The Total Environment,* 885**,** 163907.

Yang, T.-S., L. K.-P. Chao & T.-T. Liu (2014) Antimicrobial activity of the essential oil of Glossogyne tenuifolia against selected pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 94**,** 2965-2971.

Yang, X., S. Zhao, Y. Deng, W. Xu, Z. Wang, W. Wang, R. Lv & D. Liu (2023b) Antibacterial activity and mechanisms of α-terpineol against foodborne pathogenic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 107**,** 6641-6653.

Yao, J. H., D. K. Niu, Z. Li, Y. Liang & S. Q. Zhang (2010) Effects of antibiotics oxytetracycline on soil enzyme activities and microbial biomass in wheat rhizosphere. *Sci. Agr. Sin.,* 43**,** 721-728.

Yao, Y. & Q. X. Li (2023) Efficient, fast and robust degradation of chlortetracycline in wastewater catalyzed by recombinant Arthromyces ramosus peroxidase. *Science of The Total Environment,* 858**,** 159872.

Ye, C., Y. Liu, J. Zhang, T. Li, Y. Zhang, C. Guo, M. Yang, X. He, Y. Zhu, H. Huang & S. Zhu (2021) α-Terpineol fumigation alleviates negative plant-soil feedbacks of Panax notoginseng via suppressing Ascomycota and enriching antagonistic bacteria. *Phytopathology Research,* 3**,** 13.

Yi, H., G. Yuan, S. Li, X. Xu, Y. Guan, L. Zhang & Y. Yan (2022) Drug Combinations to Prevent Antimicrobial Resistance: Various Correlations and Laws, and Their Verifications, Thus Proposing Some Principles and a Preliminary Scheme. *Antibiotics,* 11.

Yip, D. W. & V. Gerriets (2024) Penicillin.

Yu, Y., X. Li, Z. Liu, Y. Xu & Y. Shen (2022) Effects of Chlortetracycline Rumen-Protected Granules on Rumen Microorganisms and Its Diarrhea Therapeutic Effect. *Frontiers in Veterinary Science,* 9.

Zaman, M., M. L. Nguyen, J. D. Blennerhassett & B. F. Quin (2008) Reducing NH3, N2O and $${\text{NO}}_3^ - $$–N losses from a pasture soil with urease or nitrification inhibitors and elemental S-amended nitrogenous fertilizers. *Biology and Fertility of Soils,* 44**,** 693-705.

Zawahir, S., H. T. T. Le, T.-A. Nguyen, J. Beardsley, A. D. Dang, S. Bernays, K. Viney, T. H. Cao, D. Drabarek, H. H. Tran, S. T. Nguyen, V. T. T. Pham, T. M. Luong,

H. T. M. Tran, N. V. Nguyen, S. Jan, B. J. Marais, J. Negin, G. B. Marks & G. J. Fox (2022) Inappropriate supply of antibiotics for common viral infections by community pharmacies in Vietnam: A standardised patient survey. *The Lancet Regional Health - Western Pacific,* 23**,** 100447.

Zhai, W., W. Jiang, Q. Guo, Z. Wang, D. Liu, Z. Zhou & P. Wang (2023) Existence of antibiotic pollutant in agricultural soil: Exploring the correlation between microbiome and pea yield. *Science of The Total Environment,* 871**,** 162152.

Zhang, B., X. Wu, X. Tai, L. Sun, M. Wu, W. Zhang, X. Chen, G. Zhang, T. Chen, G. Liu & P. Dyson (2019a) Variation in Actinobacterial Community Composition and Potential Function in Different Soil Ecosystems Belonging to the Arid Heihe River Basin of Northwest China. *Frontiers in Microbiology,* 10.

Zhang, C., J. Li, F. Cheng & Y. Liu (2018a) Enhanced phenol removal in an innovative lignite activated coke-assisted biological process. *Bioresource Technology,* 260**,** 357-363.

Zhang, G., K. Sun, G. Ai, J. Li, N. Tang, Y. Song, C. Wang & J. Feng (2019b) A novel family of intrinsic chloramphenicol acetyltransferase CATC in Vibrio parahaemolyticus: Naturally occurring variants reveal diverse resistance levels against chloramphenicol. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 54**,** 75-79.

Zhang, L., S. Du, X. Zhang, G. Lyu, D. Dong, X. Hua, W. Zhang & Z. Guo (2020a) Occurrence, distribution, and ecological risk of pharmaceuticals in a seasonally ice-sealed river: From ice formation to melting. *Journal of Hazardous Materials,* 389**,** 122083.

Zhang, L., W. Fang, X. Li, W. Lu & J. Li (2020b) Strong linkages between dissolved organic matter and the aquatic bacterial community in an urban river. *Water Research,* 184**,** 116089.

Zhang, L., L. Song, P. Zhang, T. Liu, L. Zhou, G. Yang, R. Lin & J. Zhang (2015) Solubilities of Naringin and Naringenin in Different Solvents and Dissociation Constants of Naringenin.

Zhang, L. & Z. Xu (2008) Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments,* 8**,** 379-388.

Zhang, M., Q. Sun, P. Chen, X. Wei & B. Wang (2022a) How microorganisms tell the truth of potentially toxic elements pollution in environment. *Journal of Hazardous Materials,* 431**,** 128456.

Zhang, P., Z.-H. Yan, G. Lu & Y. Ji (2019c) Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on Daphnia magna. *Environmental Science and Pollution Research,* 26.

Zhang, Q., O. Kang, S. Jabeen & W. A. Dick (2017) Alterations in soil microbial communities caused by treatments with penicillin or neomycin. *Environmental Science and Pollution Research,* 24**,** 18651-18662.

Zhang, Q.-Y., Z.-B. Yan, Y.-M. Meng, X.-Y. Hong, G. Shao, J.-J. Ma, X.-R. Cheng, J. Liu, J. Kang & C.-Y. Fu (2021a) Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research,* 8**,** 48.

Zhang, S., C. Fan, Y. Wang, Y. Xia, W. Xiao & X. Cui (2018b) Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. *Canadian Journal of Microbiology,* 64**,** 968-978.

Zhang, S., W. Sun, L. Xu, X. Zheng, X. Chu, J. Tian, N. Wu & Y. Fan (2012) Identification of the para-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in pseudomonas sp. 1-7. *BMC Microbiology,* 12**,** 27.

Zhang, T., Y. Ding, J. Peng, Y. Dai, S. Luo, W. Liu & Y. Ma (2022b) Effects of Broad-Spectrum Antibiotic (Florfenicol) on Resistance Genes and Bacterial Community Structure of Water and Sediments in an Aquatic Microcosm Model. *Antibiotics,* 11**,** 1299.

Zhang, T., R. Nickerson, W. Zhang, X. Peng, Y. Shang, Y. Zhou, Q. Luo, G. Wen & Z. Cheng (2024) The impacts of animal agriculture on One Health—Bacterial zoonosis, antimicrobial resistance, and beyond. *One Health,* 18**,** 100748.

Zhang, T., J. Peng, Y. Dai, X. Xie, S. Luo, Y. Ding & Y. Ma (2023) Effect of florfenicol on nirS-type denitrifying communities structure of water in an aquatic microcosm model. *Frontiers in Veterinary Science,* 10.

Zhang, W., L. Chen, R. Zhang & K. Lin (2016) High throughput sequencing analysis of the joint effects of BDE209-Pb on soil bacterial community structure. *Journal of Hazardous Materials,* 301**,** 1-7.

Zhang, X., S. Linghu, Z. Chen, H. Gu, X. Chen, X. Wei, X. Hu, Y. Yang & Y. Gao (2022c) Bacterial diversity evolution process based on physicochemical characteristics of sludge treating hydroquinone during acclimation. *Environmental Science and Pollution Research,* 29**,** 31686-31699.

Zhang, X., Y. Song, X. Ci, N. An, J. Fan, J. Cui & X. Deng (2008) Effects of florfenicol on early cytokine responses and survival in murine endotoxemia. *International Immunopharmacology,* 8**,** 982-988.

Zhang, Y., R. Feng, L. Li, X. Zhou, Z. Li, R. Jia, X. Song, Y. Zou, L. Yin, C. He, X. Liang, W. Zhou, Q. Wei, Y. Du, K. Yan, Z. Wu & Z. Yin (2018c) The Antibacterial Mechanism of Terpinen-4-ol Against Streptococcus agalactiae. *Current Microbiology,* 75**,** 1214-1220.

Zhang, Y., P. Guo, M. Wang, Y. Wu, Y. Sun, H. Su & J. Deng (2021b) Mixture toxicity effects of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol in Daphnia magna under different temperatures. *Ecotoxicology,* 30**,** 1-12.

Zhang, Y., P. Guo, Y. Wu, M. Wang, J. Deng, H. Su & Y. Sun (2021c) Evaluation of the Acute Effects and Oxidative Stress Responses of Phenicol Antibiotics and Suspended Particles in Daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry,* 40.

Zhang, Y., P. Guo, Y. Wu, X. Zhang, M. Wang, Y. Sun, J. Deng & H. Su (2018d) Evaluation of the subtle effects and oxidative stress response of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in Daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry,* 38.

Zhao, H., S. Shi, H. Zhao, J. Guo, Z. Yang, H. Gao & F. Lu (2019) Proteomic analysis of the earthworm Eisenia fetida exposed to oxytetracycline in soil. *RSC Advances,* 9**,** 41628-41638.

Zhao, J., X. Chen, L. Bao, Z. Bao, Y. He, Y. Zhang & J. Li (2016) Correlation between microbial diversity and toxicity of sludge treating synthetic wastewater containing 4-chlorophenol in sequencing batch reactors. *Chemosphere,* 153**,** 138-145.

Zhou, L.-J., G.-G. Ying, J.-L. Zhao, J.-F. Yang, L. Wang, B. Yang & S. Liu (2011) Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. *Environmental Pollution,* 159**,** 1877-1885.

Zhou, Q., X. Xie, F. Feng, S. Huang & Y. Sun (2021) Impact of acyl-homoserine lactones on the response of nitrogen cycling in sediment to florfenicol stress. *Science of The Total Environment,* 785**,** 147294.

Zhou, Z., Z. Zhang, L. Feng, J. Zhang, Y. Li, T. Lu & H. Qian (2020) Adverse effects of levofloxacin and oxytetracycline on aquatic microbial communities. *Science of The Total Environment,* 734**,** 139499.

Zielezny, Y., J. Groeneweg, H. Vereecken & W. Tappe (2006) Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. *Soil Biology and Biochemistry,* 38**,** 2372-2380.

Zounková, R., Z. Klimešová, L. Nepejchalová, K. Hilscherová & L. Bláha (2011) Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. *Environmental toxicology and chemistry,* 30.

Álvarez-Martínez, F. J., E. Barrajón-Catalán & V. Micol (2020) Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review. *Biomedicines,* 8.

Årdal, C., M. Balasegaram, R. Laxminarayan, D. McAdams, K. Outterson, J. H. Rex & N. Sumpradit (2020) Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges. *Nature Reviews Microbiology,* 18**,** 267-274.

Özçelik, B., M. Kartal & I. Orhan (2011) Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology,* 49**,** 396-402.

Čejková, A., J. Masák, V. Jirků, M. Veselý, M. Pátek & J. Nešvera (2005) Potential of Rhodococcus erythropolis as a bioremediation organism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 21**,** 317-321.

Łobocka, M. B., A. Głowacka & P. Golec. 2018. Methods for Bacteriophage Preservation. In *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice,* eds. J. Azeredo & S. Sillankorva, 219-230. New York, NY: Springer New York.

Łukaszewicz, P., A. Białk-Bielińska, J. Dołżonek, J. Kumirska, M. Caban & P. Stepnowski (2018) A new approach for the extraction of tetracyclines from soil matrices: application of the microwave-extraction technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 410**,** 1697-1707.

Żbikowska, B., R. Franiczek, A. Sowa, G. Połukord, B. Krzyżanowska & Z. Sroka (2017) Antimicrobial and Antiradical Activity of Extracts Obtained from Leaves of Five Species of the Genus Bergenia: Identification of Antimicrobial Compounds. *Microbial Drug Resistance,* 23**,** 771-780.

Anexos

Anexos BLOQUE I

Anexo 1.1:

Ecotoxicology and Environmental Safety 274 (2024) 116185

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Ecotoxicity of five veterinary antibiotics on indicator organisms and water and soil communities

María Rosa Pino-Otín [*,1], Antonio Valenzuela, Cristina Gan, Guillermo Lorca, Natalia Ferrando, Elisa Langa, Diego Ballestero

Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, Zaragoza 50830, Spain

ARTICLE INFO

Edited by Mohamed Abdel-Daim

Keywords:
Antibiotic ecotoxicity
Microbial communities
Daphnia magna
Vibrio fischeri
Eisenia fetida
Allium cepa

ABSTRACT

This study explores the environmental effects of five common veterinary antibiotics widely detected in the environment, (chlortetracycline,CTC; oxytetracycline,OTC; florfenicol,FF; neomycin, NMC; and sulfadiazine, SDZ) on four bioindicators: *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Eisenia fetida*, and *Allium cepa*, representing aquatic and soil environments. Additionally, microbial communities characterized through 16 S rRNA gene sequencing from a river and natural soil were exposed to the antibiotics to assess changes in population growth and metabolic profiles using Biolog EcoPlates™. Tetracyclines are harmful to *Vibrio fisheri* (LC_{50} ranges of 15–25 μg/mL), and the other three antibiotics seem to only affect *D. magna*, especially, SDZ. None of the antibiotics produced mortality in *E. fetida* at concentrations below 1000 mg/kg. NMC and CTC had the highest phytotoxicities in *A. cepa* (LC_{50} = 97–174 μg/mL, respectively). Antibiotics significantly reduced bacterial metabolism at 0.1–10 μg/mL. From the highest to the lowest toxicity on aquatic communities: OTC > FF > SDZ ≈ CTC > NMC and on edaphic communities: CTC ≈ OTC > FF > SDZ > NMC. In river communities, OTC and FF caused substantial decreases in bacterial metabolism at low concentrations (0.1 μg/mL), impacting carbohydrates, amino acids (OTC), and polymers (FF). At 10 μg/mL and above, OTC, CTC, and FF significantly decreased metabolizing all tested metabolites. In soil communities, a more pronounced decrease in metabolizing ability, detectable at 0.1 μg/mL, particularly affected amines/amides and carboxylic and ketonic acids ($p < 0.05$). These new ecotoxicity findings underscore that the concentrations of these antibiotics in the environment can significantly impact both aquatic and terrestrial ecosystems.

1. Introduction

Antibiotics (ABXs) have been used on a large scale not only to treat human infections, but also in livestock where they have also been used preventively or for promoting growth (Hao et al., 2014).

Despite the discrepancies in the data collection methods (Oliver et al., 2020), an average annual antimicrobial consumption per kilogram of animal produced has been estimated at 172 mg/kg for pigs, 148 mg/kg for chicken and 45 mg/kg for cattle. Moreover, between 2010 and 2030, the global consumption of veterinary antimicrobials is expected to increase from 63151 ± 1560 tons to 105596 ± 3605 tons, a 67% increase (Van Boeckel et al., 2015). Other estimates predict increases of up to 200000 tons in 2030 (Klein et al., 2018).

The most commonly sold antibiotic classes in 31 European countries were (after penicillins, 31.2%) tetracyclines (chlortetracycline and oxytetracycline, 25.8%), sulfonamides such as sulfodiazine (9.9%) and aminoglycosides such as neomycin (5.9%). Amphenicols (Florfenicol) already account for 2.8% (EMA, 2022 report).

This massive consumption has generated a series of problems encompassing human, animal and environmental health (Berkner et al., 2014; Bielen et al., 2017; Carvalho and Santos, 2016; Pino-Otin et al., 2022), which are interrelated areas in the holistic concept of One Health (Robinson et al., 2016).

Animals, as well as humans, are not able to metabolize antibiotics efficiently, so a high percentage of the whole or metabolized product is excreted via urine or feces. For example, up to 90% of the active

* Correspondence to: Universidad San Jorge, Campus Universitario Villanueva de Gállego, Autovía A- 23 Zaragoza-Huesca, km. 510, Villanueva de Gállego, Zaragoza 50830, Spain.
E-mail addresses: rpino@usj.es (M.R. Pino-Otín), avalenzuela@usj.es (A. Valenzuela), cgan@usj.es (C. Gan), glorca@usj.es (G. Lorca), nferrando@usj.es (N. Ferrando), elanga@usj.es (E. Langa), dballestero@usj.es (D. Ballestero).
[1] www.usj.es

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116185
Received 4 October 2023; Received in revised form 15 January 2024; Accepted 5 March 2024
Available online 14 March 2024
0147-6513/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

ingredient of sulfonamides or up to 65% of chlortetracycline is eliminated in this way (Quaik et al., 2020). These wastes can be channeled to wastewater treatment plants (WWTPs) that do not completely mineralize these substances, so antibiotics or their degradation products can reach waterbodies when wastewater or sewage is discharged into the environment, including rivers and lakes, as well as the marine environment (Haenelt et al., 2023; Korkmaz et al., 2022; Moldovan, 2006; Omuferen et al., 2022; Wang et al., 2021b). It is estimated that thousands of tons of antimicrobials and their transformation products enter the environment annually (Harnisz et al., 2015; Ji et al., 2012b).

The average concentrations of antibiotics in different aquatic compartments range between few ng/L to few μg/L (Barbosa et al., 2016; Bhagat et al., 2020; Loos et al., 2013; Michael et al., 2013). CTC was found in water samples of US streams with maximum concentrations of 0.69 μg/L (Kolpin et al., 2002). Detected SDZ values were as high as 840 ng/L in surface water in Nairobi (Ngigi et al., 2020) or 1.181 ng/L in the Chaobai River in China (Su et al., 2020). In river basins of China OTC was found to be the most frequent antibiotic in the aquatic environment (Guo et al., 2022), and the most abundant in river basins with concentrations of up to 361.1 μg/L and 56.1 μg/L have been detected in northern China and Colorado, USA, respectively (Jiang et al., 2014; Karthikeyan and Meyer, 2006). In literature reviews, the highest maximum concentrations, i.e., 560 μg/L, were observed for OTC in surface waters in Asia (Kovalakova et al., 2020). Fish farms can also be a source of antibiotic discharges into watercourses, especially OTC, florfenicol (FF) and sulfadiazine (SDZ) (Jara et al., 2021; Lulijwa et al., 2020).

ABXs can also reach the soil when sewage or sewage sludge is used for irrigation and can accumulate after repeated fertilizations, with tetracyclines being the most frequently detected group of antibiotics in particular CTC. For example, up to 2668.9 mg/kg of CTC were detected in soils around pig feedlots in China (Ji et al., 2012a); 9.5 μg/kg of CTC was detected in the top 10 cm of soil from eight fields fertilized with animal manure (Kolpin et al., 2002). The highest concentration (143.97 mg/Kg) of an ABX found in manure in a study in Shenyang (China) was also CTC (An et al., 2015). ABXs can leach into groundwater or even be taken up by crops (Aydin et al., 2022; Aznar et al., 2014; Bastos et al., 2020). For example, chlortetracycline (CTC) has been detected at concentrations of 0.139 mg/kg in Leek, celery, pakchoi cabbage and radish (Wang and Han, 2008) and 0.017 mg/kg in *Allium cepa* (Kumar et al., 2005); OTC ranged from 0.041 to 0.174 mg/kg in a study with more than nine crops like lettuce, carrot and potato (Yao et al., 2010), and FF was detected in lettuce and carrots (15–38 μg/Kg) (Boxall et al., 2006). Therefore, antibiotics may contaminate the human food chain (Kim et al., 2012).

While the emergence of resistance mechanisms in bacteria remains a significant environmental concern, the potential harm of antibiotics to non-target organisms is also concerning (Gonzalez-Pleiter et al., 2013; Patil et al., 2020) due their persistent discharge, bioactive characteristics and their continual presence, even at comparatively low levels ranging from ng/L to μg/L in surface waters and from ng/g to μg/g in sediments (Hernando et al., 2006; Kummerer, 2010).

Perhaps one of the best bioindicators that can estimate the impact of these antibiotics on aquatic ecosystems are the microbial communities that provide basic ecosystem services. There are not many ecotoxicity studies on riverine microbial communities, but they do show that exposure to antibiotics such as OTC and FF can produce a decrease in the microbial diversity and changes in the structure of the community (Gao et al., 2018; Harrabi et al., 2019a). Among other aquatic organisms, a recent review (Duan et al., 2022) suggested that some antibiotics, such as sulfadiazine (SDZ), pose a great risk to the aquatic system as well as algae, crustaceans and fish (Chen et al., 2020; De Orte et al., 2013; Lin et al., 2014; Wang et al., 2017), insects (Xie et al., 2019). OTCs are ranked as "toxic" to algae and aquatic plants, and "very toxic" to cyanobacteria (Kovalakova et al., 2020). OTCs an CTCs present effects (Guo and Chen, 2012; Zounkova et al., 2011) on freshwater phytoplankton alone or combined (Carusso et al., 2018) as microalgae (Bialk-Bielinska et al., 2013; Kolar et al., 2014; Siedlewicz et al., 2020; Zounkova et al., 2011), diatoms (Phaeodactylum tricornutum) and cyanobacteria (van der Grinten et al., 2010; Zhou et al., 2020). Tetracyclines also affect fish (Park and Choi, 2008), crustaceans (Mayor et al., 2008) and amphibians with an LC_{50} of 64.04 mg/L and alterations in the oxidative stress biomarkers of larvae (Lourido et al., 2022). In the same way, it was found that OTC and FF have stronger adverse effects on aquatic plants such as *Lemmna minor* (LC_{50} ranges from 0.68 to 3.26 mg/L; (Bialk-Bielinska et al., 2013; Kolodziejska et al., 2013; Machado et al., 2016; Zounkova et al., 2011). FF also appears to be toxic to algae (Goncalves Ferreira et al., 2007; Lai et al., 2009) and affects fish such as *Nile tilapia* larvae (Mattioli et al., 2020) and snails (Florencio et al., 2014). Microalgae can also be affected by neomycin (NMC) (Lee et al., 2021) with LC_{50} = 4.60 mg/L values. The aquatic invertebrate *Daphnia magna* and the bacterium *Vibrio fisheri* can serve as robust individual bioindicators for assessing the impact of antibiotics in aquatic ecosystems. *D. magna* susceptible to contaminants through both surface contact and ingestion as a filter feeder, exhibits heightened sensitivity to environmental changes (Martins et al., 2007). *V. fisheri*, with its high sensitivity, ease of use, and reliability, also proves to be an effective bioindicator (Abbas et al., 2018).

In terrestrial ecosystems, ABXs such as CTC could affect enzyme activities (Liu et al., 2015) and change microbial-mediated nitrogen behavior in soils (Stone et al., 2011), and CTC, OTC and SDZ affect microbial community structure (Hammesfahr et al., 2008; Yin et al., 2018; Zhou et al., 2020). SDZ reduces rates of nitrification and N mineralization in soils (Hammesfahr et al., 2011) and have the potential to disturb soil organic matter cycling (Qiu et al., 2021). OTC also showed toxic effects in the reproduction of terrestrial invertebrates (Giordano et al., 2010), and CTC causes DNA damage and biochemical toxicity in the earthworm *E. fetida* (Dong et al., 2012; Lin et al., 2012). These ABXs can also affect terrestrial plants. There is evidence that OTC, CTC and FF exhibit inhibitory and genotoxicity effects on root and shoot elongation of different crops (Jin et al., 2009; Kong et al., 2007; Xie et al., 2010) and OTC inhibits sorghum seed germination (Wieczerzak et al., 2018). Hence, the terrestrial invertebrate *Eisenia fetida* and the plant *Allium cepa* are commonly employed as suitable indicators for assessing soil ecotoxicity. *E. fetida*, with pivotal roles as decomposers, soil engineers, and contributors to nutrient cycling, demonstrates high sensitivity to contaminants, establishing it as an excellent indicator of soil quality (Pino-Otín et al., 2015; Wang et al., 2012). Moreover, the *A. cepa* root growth assay has seen frequent utilization as a phytotoxicity test (Caetano et al., 2018; Pino-Otín et al., 2019), attributed to its sensitivity, rapid response, ease of handling, and ability to represent effects on higher plants. The capacity of both indicators to undergo long-term assays further amplifies their utility in ecological studies.

The objective of this research is to conduct a comprehensive ecotoxicity study of five veterinary antibiotics -widely detected in the environment with evidence of damaging aquatic and terrestrial ecosystems- both, in individual non-target organisms and in communities, at different trophic levels.

To this end, the aim is to: (1) Quantify the ecotoxicity of the five ABXs on four bioindicators, two from aquatic environments (the invertebrate *Daphnia magna* and the marine bacterium *Vibrio fischeri*) and two from soils (the earthworm *Eisenia fetida* and the plant *Allium cepa*); (2) to evaluate the impact of these five ABXs on microbial communities characterized through 16 S rRNA gene sequencing and obtained from a river and natural soil on population growth, (3) Analyze sublethal effects on microbial communities, measured as changes in the metabolic profile of the microorganisms.

2. Material and methods

2.1. Antibiotics

Five veterinary antibiotics were used belonging to four families: the tetracyclines chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC), the amphenicol florfenicol (FF), the aminoglycoside neomycin (NMC) and the sulfonamide, sulfadiazine (SDZ). CAS number, supplier, purity and other details are shown in Table 1.

2.2. Daphnia magna assay

Daphnia magna (water flea) assays were conducted in accordance with OECD 202 (2004) guidelines following the standard operational procedures outlined in the Daphtoxkit FTM magna (1996) from Vidrafoc (Spain) (ref. DM121219).

The kit was stored at 5 °C until use. The Daphnia eggs were incubated for 72 h at 20–22 °C under 6000-lux light conditions in a TOXKIT model CH-0120D-AC/DC incubator (provided by ECOTEST, Spain). The neonates were pre-fed with one vial of spirulina microalgae 2 h prior to exposure to ABXs. Various solutions of ABXs were prepared in synthetic freshwater (ISO 6341 2012) at the following test concentrations: CTC (50, 100, 200, 300 and 400 μg/mL), OTC (200, 300, 400, 500 and 600 μg/mL), FF (62.5, 125, 250, 500 and 1000 μg/mL), NMC (62.5, 125, 250, 500 and 1000 μg/mL) and SDZ (62.5, 125, 250, 500 and 1000 μg/mL).

Synthetic freshwater served as the negative control, and the pH of the solutions was adjusted to 7–7.5 using 0.1 M NaOH or HCl if needed. Each concentration of ABXs was tested in five replicates per plate, with five organisms per well. Daphnids were incubated in complete darkness for 24 h at 20–22 °C. Following the 24 h exposure period, daphnids that failed to swim for 15 seconds after gentle agitation of the test vial were deemed immobile. The results were calculated as the LC_{50} (the concentration of the compound resulting in 50% of lethality).

2.3. Vibrio fischeri assay

The bioluminescence inhibition assays were conducted following the established methodology for the *V. fischeri* acute toxicity test (UNE-EN-ISO 11348–3 2009). The *V. fischeri* strain NRRL-B-11,177, obtained from Macherey-Nagel (ref. 945 006), was used in this assay. The lyophilized *V. fischeri* were rehydrated using the provided reactivation solution and stored at 4 °C for 5 min. Antibiotic stock solutions were prepared using a 2% NaCl stock solution (v/v) at different concentrations according to the solubility of each compound: CTC (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μg/mL), OTC (7.8, 15.6, 31.2, 62.5 and 125 μg/mL), FF (62.5, 125, 250, 500 and 1000 μg/mL), NMC (250, 500, 1000, 2000 and 2500 μg/mL) and SDZ (12.5, 25, 50, 100 and 200 μg/mL). NaOH and HCl 0.1 M solutions were used to adjust the pH of the test solutions to a range between 6 and 8. The assay was performed in quadruplicate, with four tubes containing bacteria but no ABX solutions serving as negative controls.

To initiate the assay, the luminescence baseline was measured. Subsequently, 0.5 mL of each ABX dilution to be tested was added to the respective tubes, and after 30 minutes, the second measurement of luminescence inhibition was performed. The measurements were obtained using a Biofix® Lumi-10 luminometer (Macherey-Nagel). The endpoint of the test was determined by the reduction in bacterial light production. The EC_{50} (the concentration of product that generates 50% of the measured effect), was expressed as a percentage of luminescence inhibition and calculated for each concentration compared to the control.

2.4. Eisenia fetida assays

Adult *Eisenia fetida* individuals were obtained from composters at Todo Verde (Spain). Prior to testing, the earthworms were acclimated for 15 days in sphagnum peat-conditioned substrate provided by the Spanish Flowers Company (Spain) and maintained under stable conditions: 18–25 ∘C, pH 7.5–8 and 80–85% humidity.

For the ecotoxicity assessment, adult earthworms above 60 days old, exhibiting a clitellum and weighing 300–600 mg were selected. The toxicity tests were conducted following the guidelines of the OECD 207 (1984) methodology, as previously described(Pino et al., 2015) in standardized soil substrate: quarzitic sand (Imerys Ceramics España, S. A., Spain), kaolinic clay (Imerys Ceramics España, S.A., Spain) and sphagnum peat (Verdecora vivarium, Spain) in a 7:2:1 ratio.

Polypropylene containers with a capacity of 1 L and perforated lids for ventilation and to minimize moisture loss were filled with 600 mg of this artificial soil. Each box contained ten earthworms and ABX solutions with final concentrations of 0.1, 1.0, 10, 100 and 1000 mg/Kg and sufficient deionized water to adjust the humidity to a level of 35–45% of the dry soil weight. Negative controls were prepared following the same procedure but without ABX. Each concentration was tested in triplicate. The containers were maintained under controlled environmental conditions at 20 ± 2 ∘C, 80–85% relative humidity and 400–800 lx light intensity. Earthworm mortality was assessed after 14 days of treatment and LC_{50} calculated.

2.5. Allium cepa assay

Bulbs of *A. cepa* (var. Stuttgarter Riesen, 14/21 gauge) were obtained from the Fitoagrícola Company (Spain). Prior to the test, young bulbs

Table 1
Properties of the antibiotics studied.

Antibiotic	Abbreviation	Family	CAS number	Supplier	Purity	Molecular weight (g/mol)	Water solubility (mg/mL)	pKa1/ pKa2	Log Ko/ w
Chlortetracycline	CTC	Tetracyclines	57–62–5	Sigma-Aldrich	>99%	478.88	0742[a]	3,3[e]	0,72[a]
Oxytetracycline	OTC		2058–46–0	Sigma-Aldrich	>99%	496.89	100[b]	3,18[f]	-2,9[a]
Florfenicol	FF	Amphenicols	73231–34–2	Laboratorios Karizoo S.A	-	358.21	9,94[a]	10,73[e]	-0,04[a]
Neomycin	NMC	Aminoglycosides	1404–04–2	Laboratorios Karizoo S.A	-	614.64	>250[c]	12,9[g]	-3,7[g]
Sulfadiazine	SDZ	Sulfonamides	68–35–9	Acofarma	>99%	250.28	0077[d]	6,36[h]	-0,09[i]

[a] (Rathborey Chan et al., 2020)
[b] (National Center for Biotechnology Information, 2023a)
[c] (National Center for Biotechnology Information, 2023b)
[d] (Rose-Marine Dannenfelser et al., 1991)
[e] (Settimo L et al., 2014)
[f] (Drugbank, 2023)
[g] (Sarmah AK et al., 2006)
[h] (Ritter S et al. 1995)
[i] (Corwin Hansch et al., 1995)

were carefully peeled, taking care to avoid damage to the root ring. Acute toxicity experiments with *A. cepa* were conducted following the method outlined by Fiskesjo (1993). The bulbs were placed in 15 mL tubes and mineral water (VERI, Aguas de San Martín de Veri S.A., Spain) was used as the growth medium due to its appropriate calcium and magnesium content (https://www.veri.es/es/el-producto). Ecotoxicological tests were performed with 12 replicates for each concentration: 0.03, 0.3, 3.0, 30 and 300 mg/L. The negative control consisted of water. The bulbs were cultivated in an incubator under light conditions at 25 °C for 72 hours, with the test solutions being refreshed every 24 hours. Root growth inhibition was measured as end point and EC50 calculated.

2.6. River and soil microorganism assays

2.6.1. River samples

Water samples were collected on October 2022 from the Gallego River (Zaragoza, Spain) and transported to the laboratory according to standard procedures (ISO 19458:2006, AENOR ISO 19458:2006, AENOR). This sample was used for genetic analysis, chemical analysis and Biolog EcoPlates™ assays (Tiselab S.L., Spain). In situ parameters were also measured: water temperature 17 ºC (Nahita thermometer); pH = 7.5 (PanReac AppliChem, A011435) and conductivity of 2.8 mS (conductivity meter Hanna HI8733).

For genetic analysis, microorganisms were obtained from 5 L of river water. The water was filtered through a 0.22 μm cellulose nitrate filter (Sartorius) using a vacuum flask. The filtered microorganisms were then resuspended in a sterile Falcon tube containing 50 mL of phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 5000 g for 10 min. The supernatant was discarded, and the resulting pellet was stored at −80 °C for subsequent sequencing.

For the ecotoxicity assays, 1 L of river water was filtered through a 70 μm nylon sieve (BD Falcon) to remove debris. The filtered water was then stored at 4 °C in the dark until being used in Biolog EcoPlates™. Two liters were taken the same day of sampling to the Laboratorios Valero Analítica (Zaragoza, Spain) for physicochemical analysis.

2.6.2. Soil samples

Soil samples were collected on November 2022 from a pesticide-free and contaminant-free crop field located at Agri-food research and technology center of Aragon (CITA, www.cita-aragon.es) in Zaragoza, NE Spain. The soil composition was analyzed by the CITA Soil and Irrigation Unit (Supporting Information 1).

For the genetic analysis, 20 g of soil were mixed with 100 mL of sterile water. The mixture was stirred for 30 min under sterile conditions and allowed to settle for 1 h. Next, 10 mL of the sample was transferred to Falcon tubes and subjected to sonication for 1 min, followed by centrifugation at 1000 g for 10 min. The supernatant was collected under sterile conditions, and the soil microorganisms were obtained by filtering the supernatant through a 0.22 μm cellulose nitrate filter (Sartorius) using a vacuum flask. The content of the filter was carefully washed with sterilized PBS, then centrifuged at 5000 g for 10 min. The resulting pellets were collected with an eyedropper and stored at −80 °C until sequencing.

Before conducting the ecotoxicity assays, 10 g of soil were passed through a 2 mm sieve (Becton Dickinson, Spain). To this pre-sieved soil, 95 mL of sterile water was added, and the sample was stirred in an Erlenmeyer flask for 30 min and allowed to settle for 1 h. Then, 10 mL of the upper portion of the flask was transferred to Falcon tubes and centrifuged at 1000 g for 10 min, with the supernatant collected under sterile conditions. This process was repeated five times. The total obtained supernatant was filtered through a 70 μm nylon sieve (Becton Dickinson, Spain) to remove suspended soil debris, resulting in a sufficient sample volume for inoculation in Biolog plates.

2.6.3. Community-level physiological profiling (CLPP) of river and soil microorganisms

To evaluate the impact of ABXs on the metabolic activity of microbial communities in water and soil, we employed the Biolog EcoPlate test (Tiselab S.L., Spain). This test allowed us to monitor changes in the utilization of 31 different carbon sources, as previously described (Pino-Otin et al., 2017; Rosa Pino-Otin et al., 2019). For the ecotoxicity assessment, we prepared various concentrations of ABXs (0.1, 10 and 100 μg/mL) in a final volume of 150 μL within the wells of a Biolog plate. We used prefiltered river water (refer to Section 2.6.1) or the supernatant obtained from the soil sample (refer to Section 2.6.2) to evaluate the impact of ABXs on microbial communities in water and soil, respectively. The pH of the solutions ranged between 6 and 7. Each concentration was tested in triplicate, and all procedures were conducted under sterile conditions within a flow chamber. The plates were then placed in the dark at 25 °C for 7 days, maintaining sterile conditions throughout. Optical density (OD) measurements were taken at a wavelength of 590 nm immediately after inoculation and once daily using a Synergy H1 Microplate reader (BIO-TEK, USA) and Gen5™ data analysis software. The carbon utilization rate was determined by assessing the reduction of tetrazolium violet redox, as described by Pohland and Owen (2009).

2.6.4. Genetic identification of microbial populations

The prefiltered solution obtained at the end of Section 2.6.1 was subjected to an additional filtration step using Sartori 0.2 μm cellulose nitrate filters that had been thoroughly washed in PBS (Phosphate Buffered Saline) solution with a pH of 7.5. The PBS solution was collected in Falcon tubes and centrifuged at 5000 g for 10 min. After careful removal of the supernatants, the resulting pellets were frozen at −80 °C for genetic analysis.

DNA was extracted using the kit AllPrep® PowerViral® DNA/RNA Kit (QiaGen), following the manufacturer's instructions. After extraction, purified DNA samples were fluorimetrically quantified using Picogreen® and 1.5 ng of input DNA from each sample was used to amplify the V3–V4 region of 16 S rRNA gene. PCR primers used were 5'-ACACTGACGACATGGTTCTACACCTACGGGNGGCWGCAG-3' and 5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGACTACHVGGGTATCTAATCC-3, which include a common extension to allow for further library preparation. The V3–V4 specific PCR consisted of 21 cycles and was made using the Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) and 100 nM primers. After amplification, positive 16 S derived bands were assessed by agarose gel electrophoresis, DNA products were diluted and a second PCR of 13 cycles was performed in the presence of 400 nM primers: 5′-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTA-CACTGACGACATGGTTCTACA-3′ and 5′-CAAGCAGAAGACGGCA-TACGAGAT-[10 nucleotides barcode]-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3′, which belong to the collection Access Array Barcode Library for Illumina Sequencers (Fluidigm). This second PCR completes the Illumina library construction and labels each sample with a unique barcode. After individual library preparation, samples were checked for size and concentration in a Tape Station (Agilent) and an equimolar pool was made, purified using AMPure beads and titrated by quantitative PCR using the "Kapa-SYBR FAST qPCR kit forLightCycler480" and a reference standard for quantification.

The pool of amplicons was denatured prior to be seeded on a flowcell at a density of 10pM, where clusters were formed and sequenced using a "MiSeq Reagent Kit v3", in a 2×300 pair-end sequencing run on a MiSeq sequencer.

The fastq files were constructed using the bcl2fastq integrated in the Illumina sequence workflow. Phylogenetic analysis was made using the 16 S Metagenomics app of Base Space v1.1.0 (Illumina). The Greengenes (13_5) database was used for taxon assignment.

2.7. Statistical analysis and visualization

To determine the dose-response curves for *D. magna* mobility, *E. fetida* survival, *A. cepa* root elongation and *V. fischeri* luminescence, we employed a logit logistic regression using the XLSTAT software (version 2014.5.03). This allowed us to calculate the corresponding LC_{50} and EC_{50} values and the confidence limits.

The microbial activity of each Biolog EcoPlate was quantified as the the Average Well Color Development (AWCD), following the method described by Garland and Mills (1991), as previously reported in other studies (Pino-Otin et al., 2021).

Graphical representations of the results were generated using appropriate visualization techniques.

$$AWCD = \sum_{i=0}^{i=12} (OD_{t=xi} - OD_{t=x0}) \quad (1)$$

where ODi is the optical density value from each well at any given time after subtracting ODt = X0 from ODt = Xi of that well.

The significance of Average Well Color Development (AWCD) differences compared to the control was assessed using a Kruskal-Wallis one-way ANOVA for non-parametric data, conducted with SPSS software (version 28.0.1.0, 142), and Student's t-test for two independent samples, utilizing XLSTAT software (version 2014.5.03) in the case of absorbances of metabolites that exhibited a normal distribution.

Finally, AWCD curves were fitted to a logistic model (Eq. 2) for sigmoid microbial growth (Peleg et al., 2007) with the Excel Solver (Microsoft 365) complement:

$$AWCD = \frac{C\max}{1 + e^{b-rt}} \quad (2)$$

where C_{max} is the carrying capacity, that is, the maximum reachable population density, r (intrinsic rate of population increase), and b is a fitting parameter. C_{max} and r were obtained for each ABX.

3. Results

3.1. Ecotoxicology of the antibiotics in Daphnia magna

Fig. 1a shows the dose-response curves of *D. magna* exposed for 24 h to the five antibiotics. There was a clear dose effect for the four ABXs tested, although with very similar LC_{50} ranges. NMC is not represented because it produced no effect at doses lower than 1000 μg/mL. LC_{50} values are shown in Table 2. Toxicity from highest to lowest was (LC_{50} values in μg/mL): NMC > CTC > FF > OTC > SDZ. All toxicity values analyzed with the chi-squared test were highly significant ($p < 0.0001$).

3.2. Ecotoxicology of the antibiotics in Vibrio fischeri

The dose-response curves of the bacteria *V. fischeri* exposed for 30 min to both tetracyclines are plotted in Fig. 1b. The other antibiotics presented LC_{50} values > 200 μg/mL. The EC_{50} values of the tetracyclines are shown in Table 2. The other three ABXs (FF, NMC and SDZ) had LC_{50} values higher than the concentrations tested. The chi-squared tests were highly significant ($p < 0.0001$) in both cases.

3.3. Ecotoxicology of the antibiotics in Allium cepa

In Fig. 1c, the dose-response curves of *A. cepa* exposed for 72 hours to CTC and NMC are shown. The other antibiotics presented EC_{50} values > 300 μg/mL. All values can be seen in Table 2. The chi-squared tests were highly significant ($p < 0.0001$) in both cases.

3.4. Ecotoxicology of the antibiotics in E. fetida

None of the five antibiotics tested on *E. fetida* showed toxicity. The

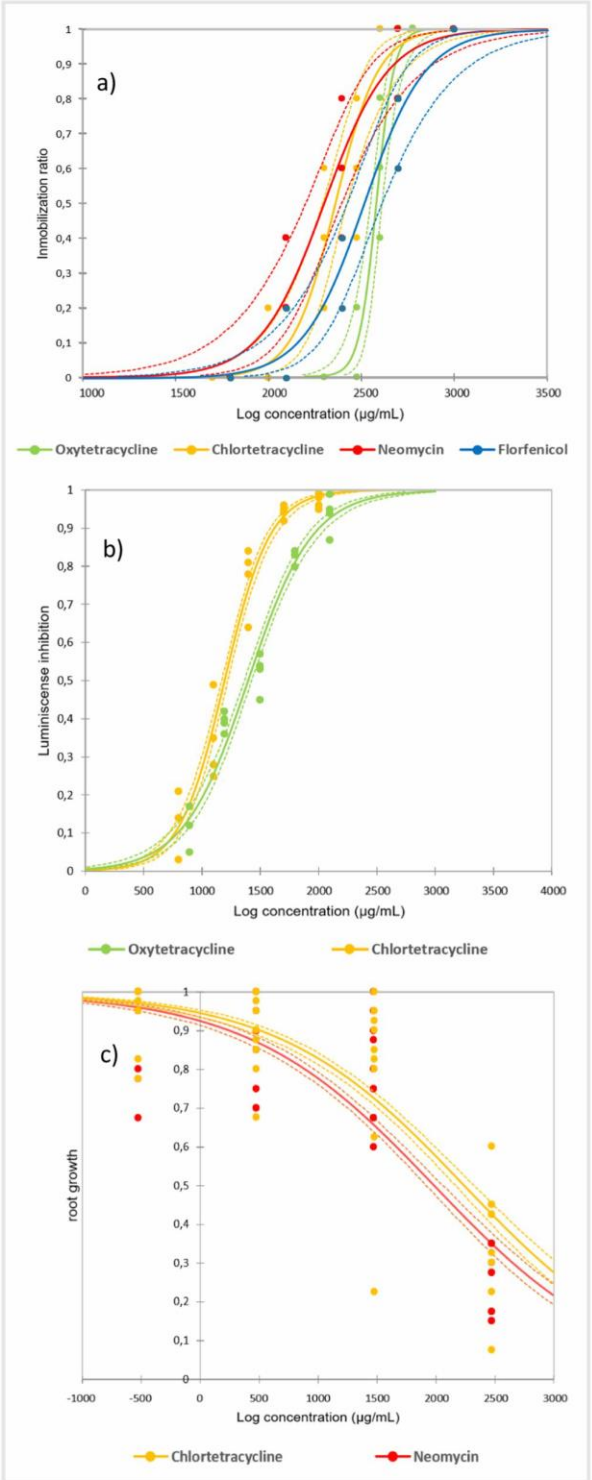


Fig. 1. Dose-response curve for (a) *Daphnia magna* after 24 h of exposure to oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC), neomycin (NMC) and florfenicol (FF), (b) *Vibrio fischeri* after 30 min of exposure to OTC and CTC and (c) *Allium cepa* after 72 h of exposure to CTC and NMC. Dashed lines indicate the confidence limits (95%). Antibiotics with LC_{50} or EC_{50} outside the studied range have not been represented.

Table 2
Ecotoxicology of antibiotics on bioindicators and river and soil microorganism communities. The last row contains values from the literature for tests under the same conditions.

Antibiotic	Daphnia magna (μg/mL)		Vibrio fischeri (μg/mL)		Eisenia fetida (mg/Kg)		Allium cepa (μg/mL)		River Microrganisms (μg/mL)		Soil Microorganisms (μg/mL)	
	$LC_{50\ (24\ h)}$	$LC_{10\ (24\ h)}$	$EC_{50(30')}$	$EC_{10(30')}$	LC_{50}	LC_{10}	EC_{50}	EC_{10}	$LC_{50\ (120\ h)}$	$LC_{10(120\ h)}$	$LC_{50(120\ h)}$	$LC_{10(120\ h)}$
Chlortetracycline	229.6[(1)] (195.3–264.2)	128.0 (84.5–158.2)	15.6 (14.7–16.6)	5.8 (5.17–6.5)	>1000	94.4 (8.7–290.1)	174 (146.3–210.5)	3.2 (2.5–4.1)	11.7 (10.3–32.9)	5.9 (0.2–7.8)	4.6 (1.6–7.3)	0.7 (0.04–1.8)
Oxytetracycline	383.1[(2)] (354.8–409.6)	302.1 (254.5–331.2)	24.9[(4)] (23.1–26.7	6.2 (5.2–7.1)	>1000	>10	>300	-	<10	<0.1	2.4 (0.03–6.9)	0.02 (0.0–0.3)
Florfenicol	326.4 (263.5–406.3)	141.6 (87.8–186.1)	>1000[(5)]	-	>1000	>1000	>300	-	<10	<0.1	14.9 (9.7–21.0)	1.4 (0.5–2.7)
Neomycin	200.6[(3)] (159.4–249.5)	83.8 (49.3–112.7)	2587 (2533–2660)	2073 (1995–2131)	>1000	>10	97.4 (83.2–115.2)	1.2 (1.4–2.3)	36.7 (26.5–50.0)	4.2 (2.0–7.0)	45.9 (25.5–75.7)	0.6 (0.08–1.9)
Sulfadiazine	>1000	563.3 (251.0–760.3)	>200	-	>1000	>1000	>300	-	<10	<0.1	0.2 (0.0–4.3)	0.0 (0.0–0.0)

Daphnia magna
[(1)] $LC_{50\ (24\ h)}$= 380,1(Park and Choi, 2008)
[(2)] $LC_{50\ (24\ h)}$= >100 (Wollenberger et al., 2000)
>400 (Zounkova et al., 2011).
22,64 (Isidori et al., 2005)
>800 (Park and Choi, 2008)
[(3)] $LC_{50\ (24\ h)}$= 116,6 (Park and Choi, 2008)
Vibrio fischeri
[(4)] $LC_{50\ (30')}$= 64,50 (Isidori et al., 2005)
108 (Kolodziejska et al., 2013)
121,01 (Lalumera et al., 2004)
[(5)] $LC_{50\ (30')}$= 29,4 (Kolodziejska et al., 2013).

LC_{50} values obtained were > 1000 mg/kg. In some cases, such as CTC, the LC_{10} could be estimated (Table 2). Only in the cases of CTC, OTC and NMC, one or two worm deaths were observed at 100 mg/kg.

3.5. Ecotoxicology of the antibiotics in river microorganism communities

3.5.1. Genetic 16 s sequencing of river microbial communities

The taxonomic analysis of bacteria in the water samples collected from the Gállego River is presented in Fig. 2a. The figure highlights the most prevalent taxa (> 1% of the phylum, class and order and > 2% of the family, genus and species due to greater variability). Total reads were 103496. More than 95% of the microorganisms at the taxonomic level of kingdom, phylum, class and order were identified. In the remaining levels, it was lower: 61.88% at the family level, 58.76% at the genus level and 21.27% at the species level.

3.5.2. Impact on global microbial activity

The first graphs in Figs. 3–7 (a1) show the effect of the five ABXs on the river microorganisms throughout the 6 days of the assay measured as AWCD compared to the control (black line). A clear dose effect can be seen in all cases.

At lower concentrations (0.1 μg/mL) all ABXs except NMC produced an appreciable reduction in bacterial growth, although no one showed significant differences with respect to the control ($p>0.05$). However, at 10 μg/mL OTC and FF had significant differences ($p<0.05$) from 72 h to the end of the measures. At 100 μg/mL all ABXs showed strong growth inhibition compared to the control ($p < 0.01$) except OTC and CTC which showed $p<0.05$ starting at 72 h and 96 h respectively.

The LC_{50} values were calculated for 168 hours when the growth kinetics had already reached the stationary phase (Table 2); although in some cases only estimates could be made due to the high inhibition produced, almost all values were zero.

The values defining the kinetics of the AWCD curves at all concentrations (Cmax and r) can be seen in Supporting Information 2. According to the Cmax values, we can order the five ABXs from highest to lowest toxicity on aquatic communities as follows: OTC > FF > SDZ ≈ CTC > NMC. ABXs, however, hardly affect the growth rate (r) with respect to the control.

3.5.3. Community-level physiological profiling (CLPP) of river microorganisms

Figs. 3–7 (a2–a4) show the impact of the five ABXs on the ability of river microorganisms to metabolize the five substrates of the Biolog EcoPlates™ as the difference from the control (which is 0 on the x-axis). As can be seen, the decrease in the ability to metabolize the different metabolites is dose-dependent, increasing as the concentration of the antibiotic increases.

OTC and FF caused the greatest decreases in bacterial metabolism, which was noticeable as early as 0.1 μg/mL and was significant ($p < 0.05$) for carbohydrates and amino acids in the case of exposure to OTC and polymers in the case of FF (see asterisks in Fig. 3 [a2–a4]).

At 10 μg/mL, OTC and FF produced the greatest decreases, OTC in all metabolites ($p < 0.0001$) and FF in carbohydrates ($p < 0.0001$), carboxy and ketonic acids ($p = 0.001$) and polymers ($p < 0.05$). OTC also produced significant decreases ($p < 0.001$) in polymers and amines and amides and carbohydrates ($p = 0.001$).

At 100 μg/mL, ABXs, including NMC and SDZ, produced a generalized and highly significant decrease ($p < 0.0001$) for almost all metabolites.

3.6. Ecotoxicology of the antibiotics in soil microorganism communities

3.6.1. Genetic 16 s sequencing of soil microbial communities

The sequencing of soil microorganisms shown in Fig. 2b reflects a great diversity of taxa highlighting the most prevalent ones as in the river sequencing. In this case, of the 65193 reads it was possible to

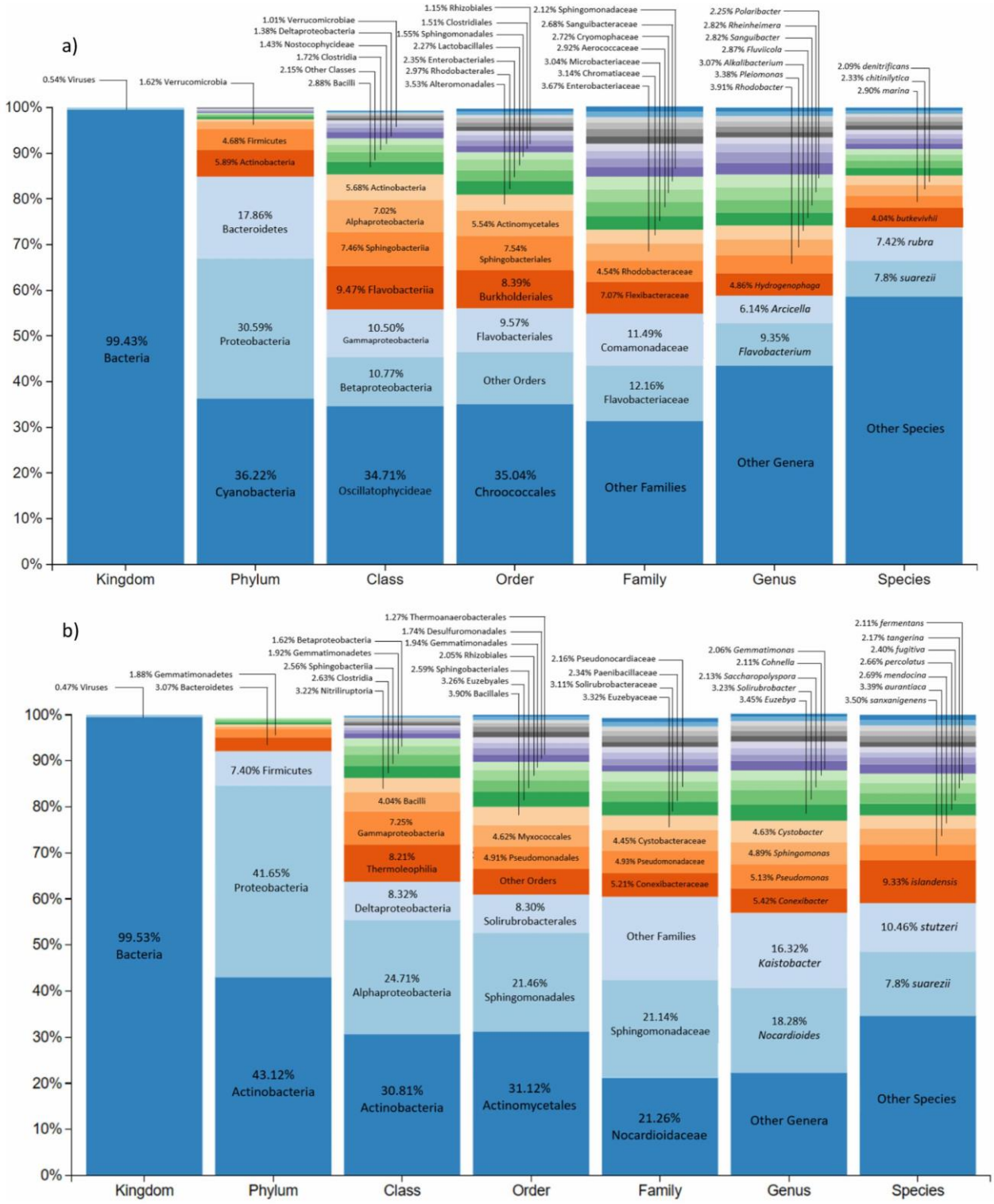


Fig. 2. Relative abundance of genetically sequenced microorganisms from river (a) and soil (b) within their taxonomic classifications at each level.

identify more than 90% of taxa at the taxonomic levels of kingdom, phylum, class and order, 88.25% to the genus and only 25.88% of species.

3.6.2. *Impact on global microbial activity*

Figs. 3–7 (b1) show the effect of the five ABXs on the soil microbial activity throughout the 7 days of the assay measured as AWCD. As in the case of the river microorganisms, a clear dose effect was observed, and

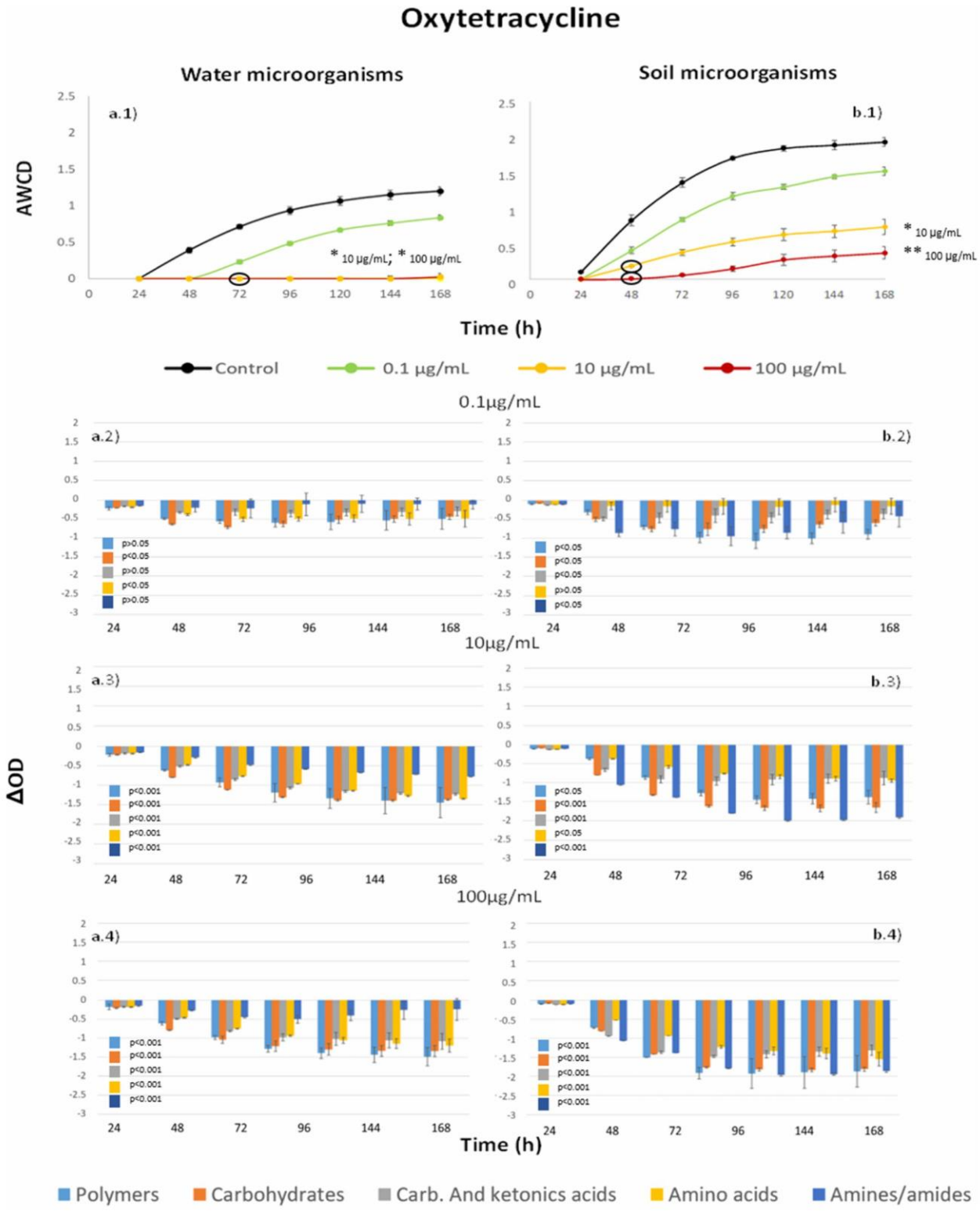


Fig. 3. Microbial growth quantified as the Average Well Color Development (AWCD) in Biolog EcoPlates based on 168 h incubation of (a.1) river and (b.1) soil microorganisms exposed to oxytetracycline. The circle surrounding the point on the AWCD curves indicates the time at which differences from the control become significant. The asterisks denote the degree of significance, *$p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Bars represent metabolic effect differentiation by carbon sources of the (a.2 to a.4.) river and (b2 to b4) soil microorganisms exposed in different concentrations to oxytetracycline respect to the control (O axis), measured as optical density (ΔOD). Each point is the average value of three replicates.

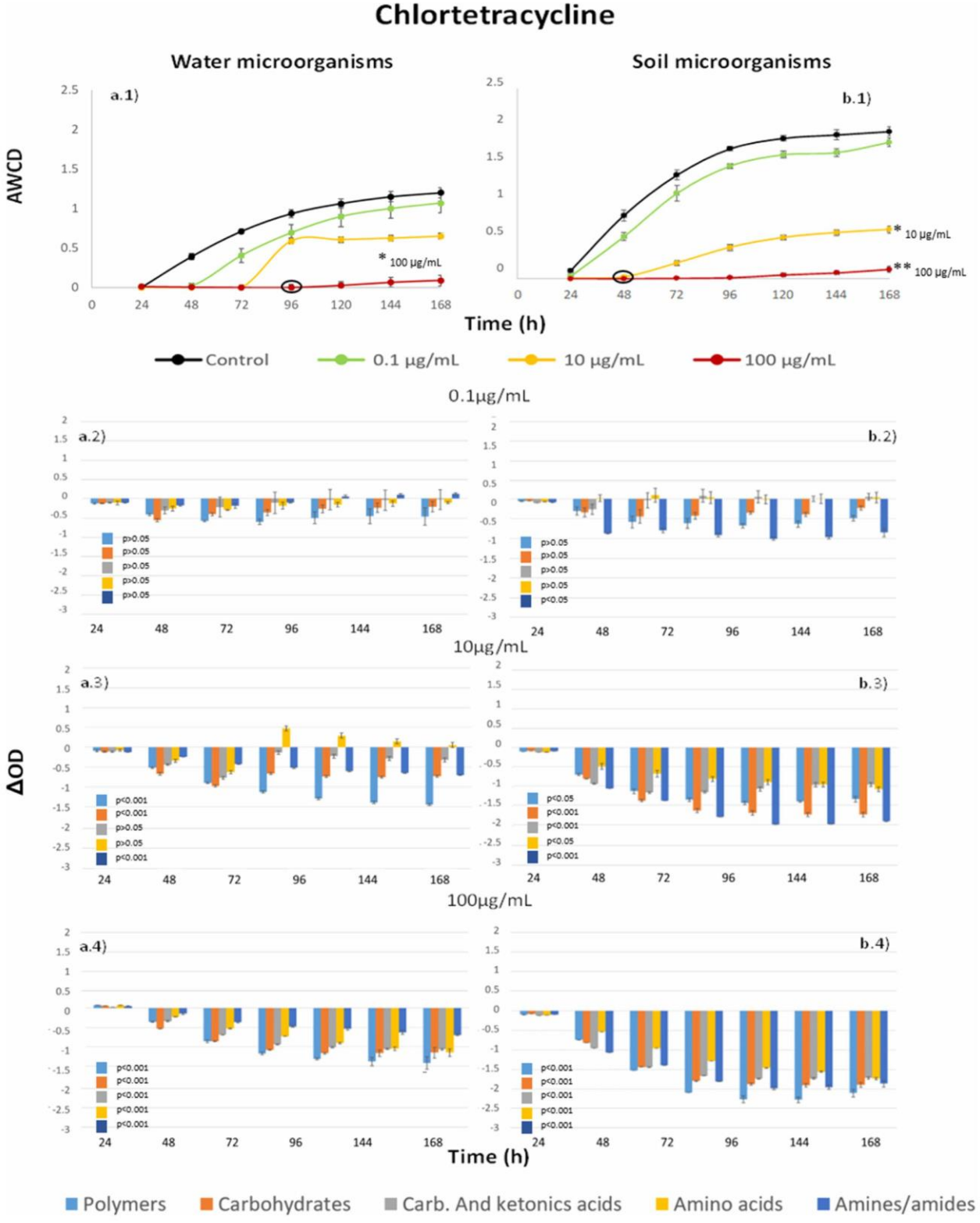


Fig. 4. Microbial growth quantified as the Average Well Color Development (AWCD) in Biolog EcoPlates based on 168 h incubation of (a.1) river and (b.1) soil microorganisms exposed to chlortetracycline. The circle surrounding the point on the AWCD curves indicates the time at which differences from the control become significant. The asterisks denote the degree of significance, *$p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Bars represent metabolic effect differentiation by carbon sources of the (a.2 to a.4.) river and (b2 to b4) soil microorganisms exposed in different concentrations to chlortetracycline respect to the control (O axis), measured as optical density (ΔOD). Each point is the average value of three replicates.

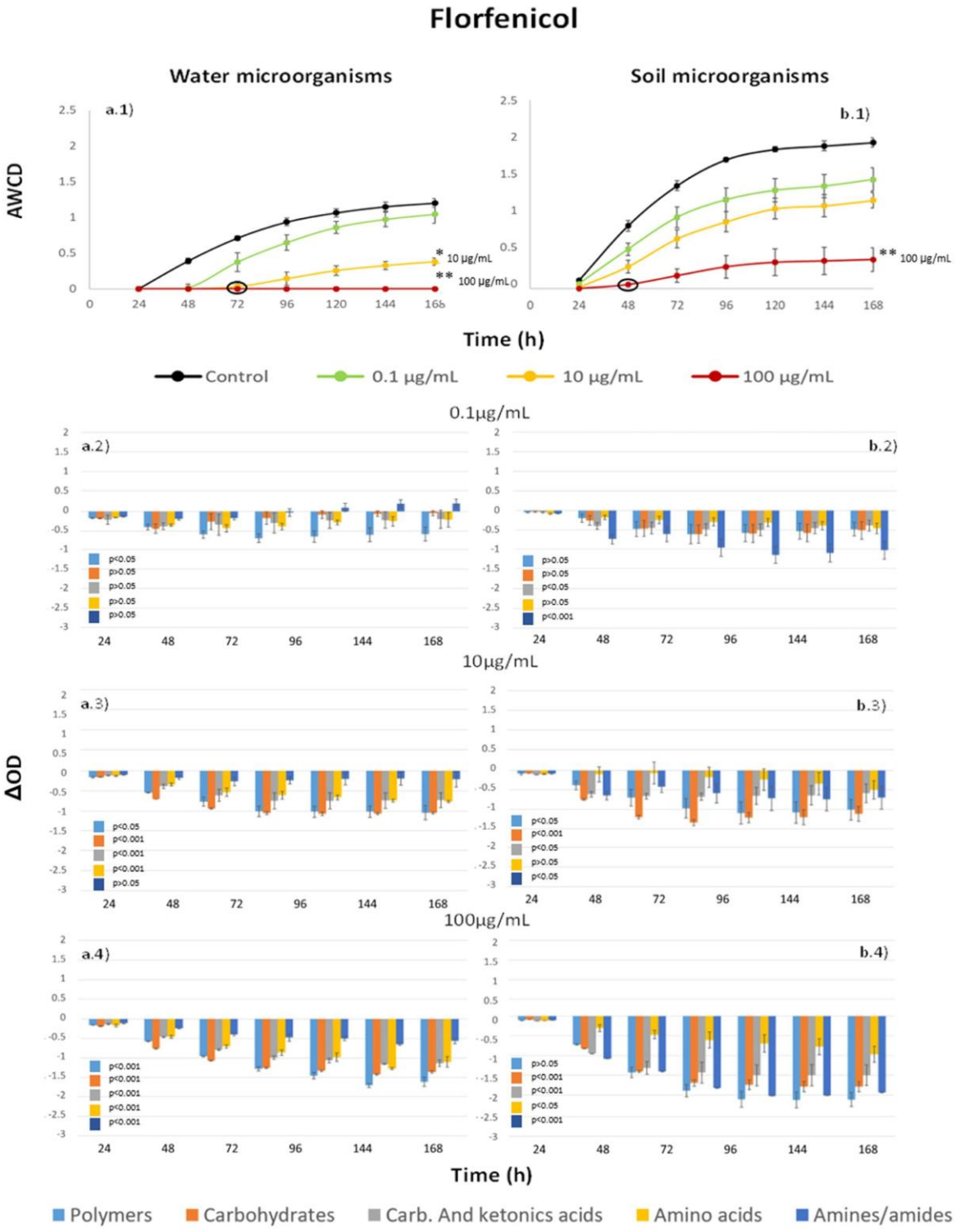


Fig. 5. Microbial growth quantified as the Average Well Color Development (AWCD) in Biolog EcoPlates based on 168 h incubation of (a.1) river and (b.1) soil microorganisms exposed to florfenicol. The circle surrounding the point on the AWCD curves indicates the time at which differences from the control become significant. The asterisks denote the degree of significance, *$p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Bars represent metabolic effect differentiation by carbon sources of the (a.2 to a.4.) river and (b2 to b4) soil microorganisms exposed in different concentrations to florfenicol respect to the control (O axis), measured as optical density (ΔOD). Each point is the average value of three replicates.

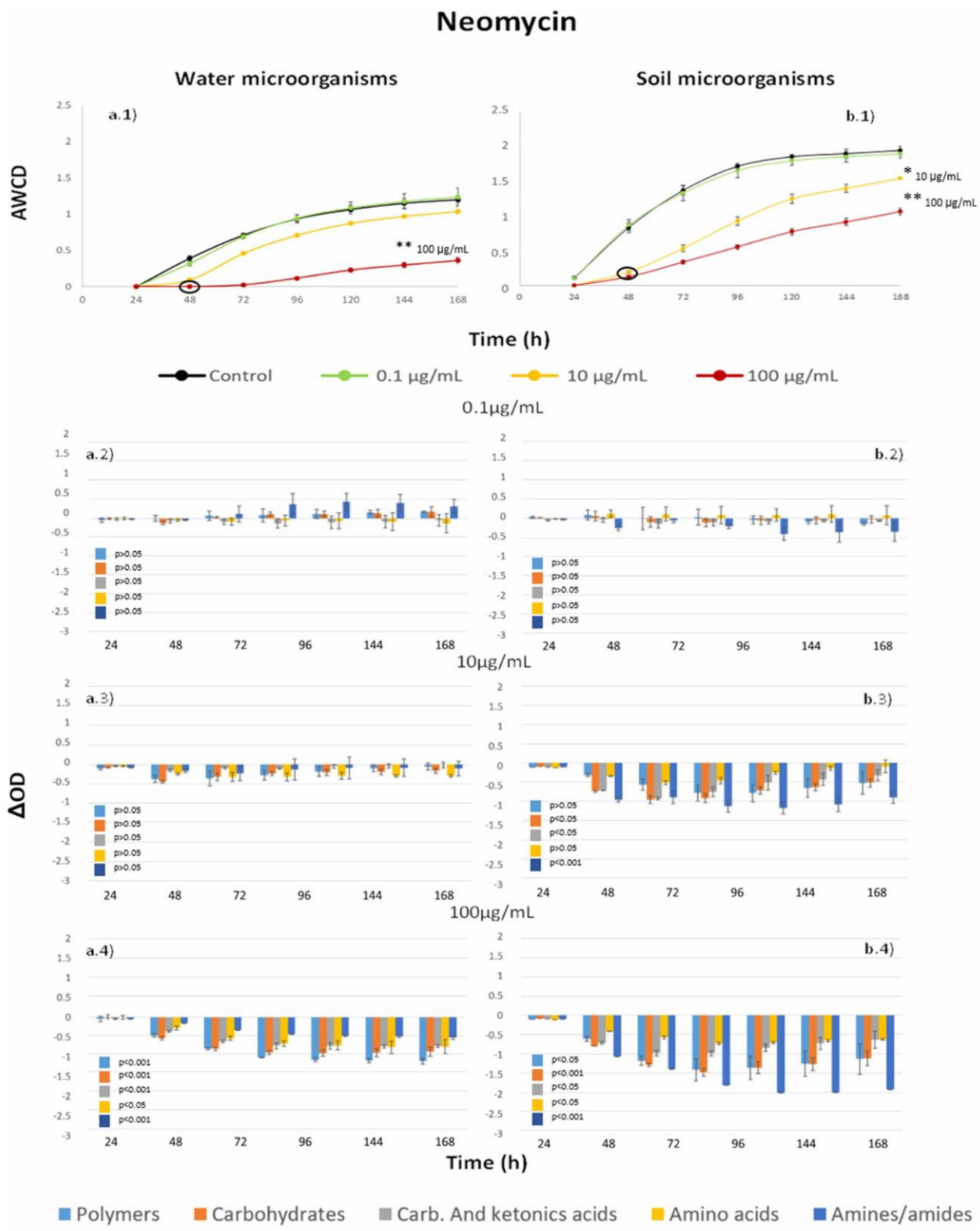


Fig. 6. Microbial growth quantified as the Average Well Color Development (AWCD) in Biolog EcoPlates based on 168 h incubation of (a.1) river and (b.1) soil microorganisms exposed to neomycin. The circle surrounding the point on the AWCD curves indicates the time at which differences from the control become significant. The asterisks denote the degree of significance, *$p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Bars represent metabolic effect differentiation by carbon sources of the (a.2 to a.4.) river and (b2 to b4) soil microorganisms exposed in different concentrations to neomycin respect to the control (O axis), measured as optical density (ΔOD). Each point is the average value of three replicates.

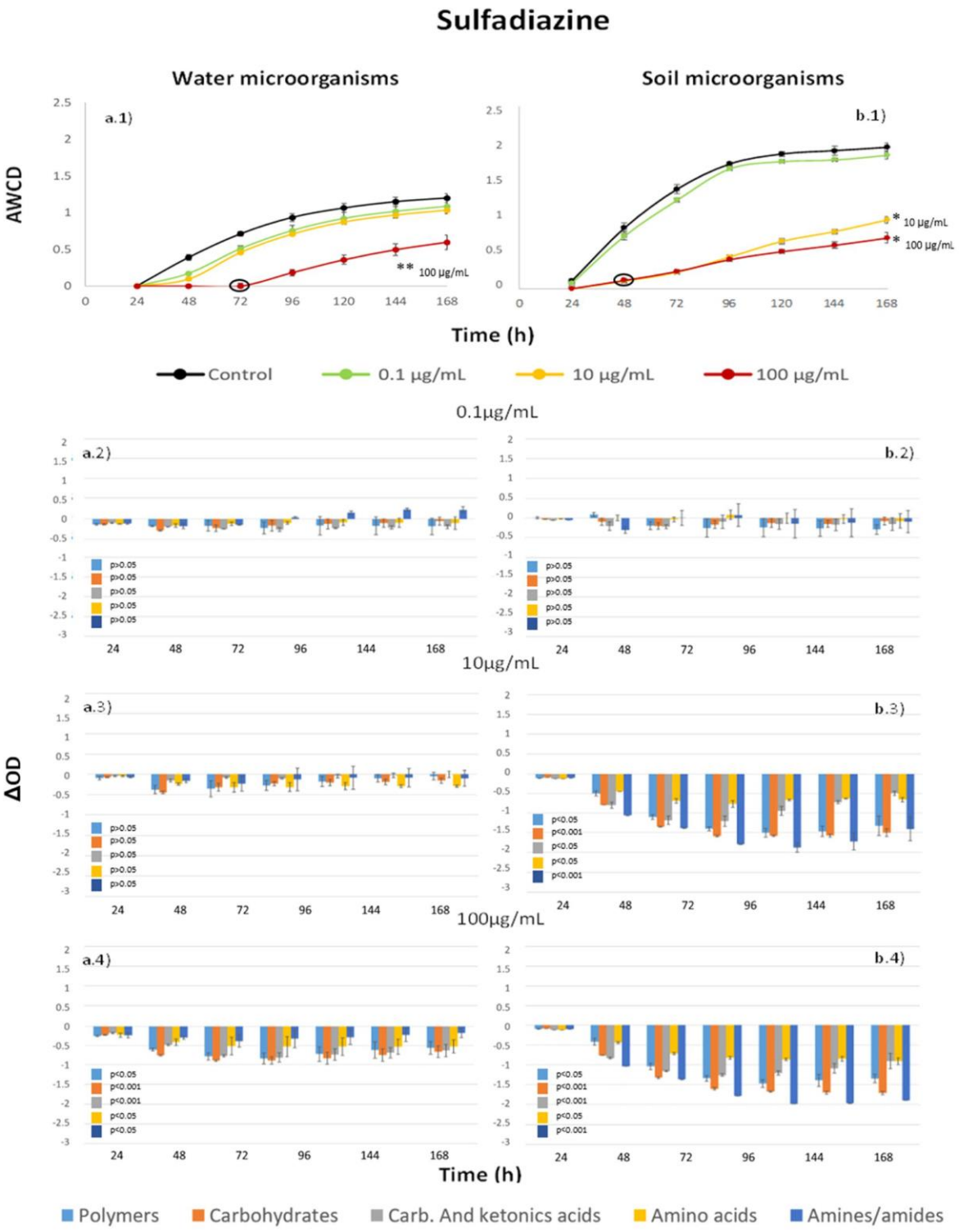


Fig. 7. Microbial growth quantified as the Average Well Color Development (AWCD) in Biolog EcoPlates based on 168 h incubation of (a.1) river and (b.1) soil microorganisms exposed to sulfadiazine. The circle surrounding the point on the AWCD curves indicates the time at which differences from the control become significant. The asterisks denote the degree of significance, *$p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Bars represent metabolic effect differentiation by carbon sources of the (a.2 to a.4.) river and (b2 to b4) soil microorganisms exposed in different concentrations to sulfadiazine respect to the control (O axis), measured as optical density (ΔOD). Each point is the average value of three replicates.

all ABXs produced significant impacts on the growth kinetics of microbial populations. ABXs did not show significant differences with respect to the control at 0.1 μg/mL ($p > 0.05$), however, from a concentration of 10 μg/mL all ABXs except FF showed significant differences in their growth ($p<0.05$) starting in all cases at 48 h and remaining until the end of the test. Finally, at 100 μg/mL, all ABXs showed strong growth inhibition compared to the control ($p<0.01$) from 48 h except SDZ which significance level started at the same time but was less determining ($p<0.05$).

LC_{50} values were also calculated for 168 hours (Table 2). All ABXs had a $LC_{50} < 10$ μg/mL except FF and NMC.

The Cmax and r values can be seen in Supporting Information 2. According to the Cmax values, we can order the five ABXs from highest to lowest toxicity on edaphic communities as follows: CTC ≈ OTC > FF > SDZ > NMC.

In this case, the microbial growth rate (r) was also affected, especially OTC, which decreased the r value by 16% on average, followed by NMC and SDZ (14% and 13%, respectively). CTC had a very small effect (10%) and FF did not affect this parameter at all.

3.6.3. Community-level physiological profiling (CLPP) of soil microorganisms

According Figs. 3–7 (b2–b4) all five antibiotics produced a dose-dependent decrease in the ability to metabolize all metabolites in all cases and that this decrease was even more pronounced than in the case of aquatic microorganisms and was already detectable at 0.1 μg/mL. At this concentration, OTC had the greatest effect on the ability of soil microorganisms to metabolize metabolites (all but aminoacids), unlike river microorganisms. OTC and FF affected some groups (amines/amides and carboxylic and ketonic acids, $p < 0.05$), but these groups were different from those affecting river microorganisms. At 10 μg/mL there was a significant decrease ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) of almost all metabolites for all ABXs, slightly less for NMC. At 100 μg/mL all ABXs produced large decreases in the ability of soil microorganisms to metabolize all metabolites ($p < 0.001$ in virtually all cases).

4. Discussion

According to our results, at environmental concentrations a direct acute toxicity effect of ABXs, on aquatic invertebrates such as *D. magna* may be unlikely. However, concentrations of up to 0.5 μg/mL could be detected in different effluents, especially OTC (Kovalakova et al., 2020). Results of river microbial communities show substantial changes in both growth and metabolic profile from 0.1 to 10 μg/mL, especially when exposed to OTC (see Fig. 3). This indicates that environmental concentrations can cause changes in the microbial community which, being key organisms in the river ecosystem and the basis of food chains, can alter the balance of the aquatic ecological environment and cause indirect environmental risks to other organisms (Zhou et al., 2020). It should not be forgotten that, although the point concentrations of ABXs to which they are exposed are low, they are persistent over time and multiple ABXs can interact with each other (Brosche and Backhaus, 2010) or with other stressors (Kong et al., 2006), so cumulative effects cannot be ruled out. In addition, some of the ABXs may bioaccumulate, as in the case of SDZ, which showed a high potential for bioaccumulation in benthic organisms (Wu et al., 2021).

Considering also the existing data on the presence of these antibiotics in the soil, even more than in the river environment, the repeated application of contaminated manure on fields or its use over prolonged periods of time can lead to the accumulation of very high concentrations of antibiotics, reaching levels as high as 1067.1 mg/kg for CTC (Quaik et al., 2020).

4.1. Ecotoxicology in aquatic indicators: Daphnia magna and Vibrio fischeri

Tetracyclines are especially harmful to marine bacteria, although they also exhibit toxicity for *D. magna*. However, the other three antibiotics seem to affect only *D. magna*, especially SDZ.

OTC and CTC are broad-spectrum antibiotics that inhibit protein synthesis by binding to the 30 S subunit of the bacterial ribosome, preventing the elongation of the polypeptide chain. The presence of the cellular target is undoubtedly the main factor in sensitivity of *V. fischeri* to tetracyclines. However, they are also small molecules of lipophilic nature (Table 1) that can cross cell membranes (both the outer membrane of the gram negative bacteria and the cell membrane) by passive diffusion and do so more efficiently in prokaryotic cells because they have a higher proportion of saturated fatty acids in their membrane or the presence of porins in the outer membrane (Thanassi et al., 1995). In addition, CTC is more lipophilic than OTC due to the presence of a chlorine group in its structure which increases its polarizability and the ability of this ABX to penetrate lipid membranes and may contribute to the higher toxicity in both *V. fischeri* and *D. magna* that we observed.

The antimicrobial spectrums of FF and SDZ exhibit broad ranges of Gram-positive and Gram-negative bacteria. NMC antimicrobial activity is primarily restricted to Gram-negative species. Both FF and NMC act by binding to the 50 S and 30 S subunits of the bacterial ribosome, respectively, inhibiting protein synthesis. The mechanism of action of SDZ is somewhat different: it acts by interfering with synthesis of folic acid because it is a structural analog of para-aminobenzoic acid (PABA), a precursor in the synthesis of folic acid, which is essential for the growth and replication of microorganisms.

According to our results, these three antibiotics are not harmful to *V. fischeri*, despite their specific mechanism of action against Gram-negative bacteria. It is possible that their physicochemical properties influence their ability to pass through the bacterial envelope and reach its target site in the bacterial cell. For example, NMC is a relatively large molecule, which might hinder its ability to pass through the pores of the outer membrane of Gram-negative bacteria, and its high hydrophilicity may make it difficult to cross the hydrophobic lipid bilayer of the bacterial outer membrane. In addition, at physiological pH, its amino group are protonated, which confers it a net positive charge, so it can be repelled by the negatively charged lipopolysaccharides (LPS) on the surface of Gram-negative bacteria. These factors would not occur in the case of FF or SDZ because they are neutral molecules at physiological pH, preventing electrostatic repulsions between these ABXs and the surface of Gram-negative bacteria. They have small sizes and lipophilic natures, making them more likely to pass through the porins of the bacterial outer membrane. Resistance mechanisms developed against these ABXs could perhaps explain their negligible effect on Gram-negative bacteria. For FF, studies detected increased expression of resistance genes in the genus *Vibrio*, among others (Kadlec et al., 2007; Li et al., 2020).

Tetracyclines can also pass through eukaryotic cells by passive diffusion, affecting *D. magna*. Likewise, eukaryotic cells possess various transporter proteins that facilitate the entry and efflux of molecules, including tetracyclines. For instance, organic anion transporters (OATs) have been implicated in the uptake of tetracyclines in certain cell types (Kobayashi et al., 2005).

The moderate lipophilicity of FF, on the other hand, allows it to dissolve in both lipid-based and aqueous environments, which, along with its relatively small molecular weight (see Table 1), facilitates it passing through the lipid bilayer of cell membranes via passive diffusion, which would explain its effect on *D. magna* being similar to tetracyclines.

It should also be noted that *D. magna* is a filter-feeding organism, so exposure to ABXs also occurs via the digestive tract. Some authors have suggested that damage after OTC exposure is produced due to the disruption of the intestinal biota of *D. magna* that could have

implications on long-term survival, energy and expenditure (Lovern and Van Hart, 2022). It is evident in any case that concentrations lower than those that produce lethality are capable of producing sublethal effects such as reproductive capacity, where lower LC_{50} values such as 86 μg/mL (Zounkova et al., 2011) or 46.2 μg/mL (Wollenberger et al., 2000) have been found. In the case of NMC, where its large size and hydrophilic nature make it difficult to cross cell membranes, its effect on *D. magna* is probably via digestive penetration. The mechanism of action of SDZ is too specific to bacterial metabolic pathways, which could explain its limited effect on *D. magna* despite being ingested.

Few studies on these antibiotics can be found in the literature, mainly focused on tetracyclines and comprising very diverse values, although in the case of *D. magna* in ranges similar to those we have found (See Table 2).

4.2. Ecotoxicology in edaphic indicators: Allium cepa and Eisenia fetida

None of the antibiotics caused mortality in *E. fetida* at concentrations below 1000 mg/Kg, however, the worms showed morphological changes such as decreases in body size and thickness in all cases. This is consistent with the observations of Cao (Cao et al., 2015) that 100 mg/kg OTC-contaminated soil (prepared with mycorrhizae and maize) did not produce *E. fetida* mortality. However, sublethal effects have been detected for both tetracyclines. For example, some morphological changes in the worms after 15 days of exposure were observed for OTC (Zhao et al., 2019). CTC induced DNA damage and biochemical stress was detected by analysis of superoxide dismutase and catalase enzyme activities in this earthworm (Dong et al., 2012; Lin et al., 2012). Damage to the integrity of lysosomal membranes and increased apoptosis of coelomocytes after exposure to OTC were also observed in *E. fetida* (Gao et al., 2015). In addition, proteomic analysis found changes in actin protein expression after OTC exposure, affecting the cell cytoskeleton, which could be a target of oxidative stress. It is noteworthy that the presence of OTC in soil at concentrations $>$ 1000 mg/kg results in a significant avoidance response (Gao et al., 2016).

As far as we can tell, there is little information on the other three ABXs and this is the first time that ecotoxicity data have been provided for *E. fetida*.

E. fetida is widely used in terrestrial ecotoxicology because it is a sensitive indicator of soil quality as it is exposed by two routes to contaminants present in the soil: the percutaneous route as they have a thin epidermal cuticle and a glandular orifice that communicates with the environment as well as a digestive route when stirring the soil. Uptake of 14 C-sulfadiazine in the earthworms, for example, was clearly detected (Norr and Riepert, 2007). Perhaps these sublethal effects lie in an impact on the gut microbiota of *E. fetida* that may determine their responses to antibiotic stress but is not aggressive enough to cause mortality. This has been suggested in the case of OTC (Saha et al., 2021) and SDZ exposure (Kotzerke et al., 2010). In fact, *E. fetida* is able to accelerate the degradation of OTC in soil, which may aid bioremediation, and would explain its resistance to ABX (Liu et al., 2020; Yang et al., 2023). For other terrestrial Oligochaeta exposed to OTC, the literature reports EC_{50} values found in ranges $>$ 3000 mg/kg, although reproduction was generally a more sensitive endpoint than survival (Baguer et al., 2000).

Although studies have shown that some of the antibiotics we studied show phytotoxicity, to our knowledge this is the first time that the ecotoxicity (EC_{50}) of these antibiotics in *Allium cepa* has been quantified.

According to our results, NMC and CTC are the antibiotics with the highest phytotoxicity on *A. cepa*. There was evidence of root length inhibition of CTC in other plants such as wheat, tobacco, lettuce and alfalfa (Kim et al., 2018; Kong et al., 2007; Wang et al., 2022; Xie et al., 2010), but little has been elucidated so far about *A. cepa* except that it did not produce effects of genotoxicity in seed germination (Magdaleno et al., 2017). There is evidence, however, that crops of *A. cepa* are able to absorb CTC (Kumar et al., 2005), which could explain the root exposure to this ABX. It should also be considered that the physicochemical properties of CTC, such as lipophilicity, size and hydrogen bonding may facilitate its entry into the plant cell and passage through the vegetal cell envelope. It has similar properties to NMC, which enables it to pass through plant cell coatings. Moreover, it is a polycationic molecule due to the presence of amino groups. Plant cell walls are negatively charged due to the presence of pectin and other anionic compounds, so electrostatic interactions between the positively charged NMC and the negatively charged cell wall components could potentially facilitate its passage through the cell wall.

Once inside the plant cell, there are indications that NMC acts as an antagonist of Phospholipase-C (Reggiani and Laoreti, 2000), which in the plant root is involved in signal transduction pathways, calcium signaling, root hair development and abiotic stress responses, which, taken together, could explain why it has the strongest antibiotic effect on A. cepa. Accordingly, Wilson (Wilson, 1950) found morphological changes in the root of *A. cepa* exposed to NMC from 3 μg/mL. In other plants such as *Arabidopsis* exposed to NMC, root elongation was also affected (Andreeva et al., 2010).

We found that CTC, FF and SDZ are low phytotoxic to *A. cepa* and little information is available on the ecotoxicity of these ABXs on plants. There is evidence that CTCs affect the seed germination of *A. cepa* (Taveira Parente et al., 2018), although they do not appear to be genotoxic to this plant (Magdaleno et al., 2017). Bartikova (Bartikova et al., 2015) demonstrated that FF can be taken up by carrot roots and lettuce leaves under laboratory conditions with enriched soil, but very little or no SDZ.

4.3. Effects on river and soil microorganism communities' metabolisms

The five antibiotics have detectable impacts on the growth and metabolism of the studied microbial communities, both fluvial and edaphic, at the concentrations tested.

The broad antibacterial spectrum of these ABXs leads to high antimicrobial activity (Luis Martinez, 2009) and the presence of their targets in the bacterial communities would explain this strong impact on microorganisms. The slight variations in the sensitivity of these communities to the different ABXs may be due to the great diversity of taxa in soil and river samples (see Fig. 2), the different physicochemical properties of the ABXs as well as differences in bacterial cell wall architecture, which will determine their ability to access the prokaryotic cell. This will cause a decrease in the most sensitive bacteria, and niches that are occupied by the more tolerant ones will predominate. This may decrease diversity even though biomass may be maintained (Suga et al., 2013) and may explain the differences in the changes we have detected in the metabolic profile of the whole community. Different resistance strategies to these ABXs cannot be ignored either (Grossman, 2016).

OTC has been reported to cause changes in the composition of prokaryotic microbial communities (Zhou et al., 2020), sometimes decreasing aquatic microbial diversity (Harrabi et al., 2019b; Hu et al., 2021). OTC seems to increase Proteobacteria (which represent 30.4% of our samples) but decreases Bacteroidetes (17% of our samples), especially Flavobacterium (Zhou et al., 2020). In the case of SDZ, the affect that we detected on the growth and metabolic capacity of river bacteria, although less than in the other antibiotics, could be due to a decrease of the bacteria that are more sensitive to this antibiotic such as Proteobacteria (30.4% of our samples) or Commamonadaceae (7.11%) (Bai et al., 2019).

As far as we know, this is the first time that the effects of these antibiotics on the metabolic profile of river bacteria has been studied, although there is previous evidence of the impact of some of these antibiotics on the compositions of bacterial communities. For example, FF seems to cause a decrease in bacteria involved in the nitrification process (Gao et al., 2018). However, Zhang (Zhang et al., 2022) detected little impact on the bacterial community structure at 0.1 μg/mL but found a dramatic effect at 100 μg/mL, which would explain the potent effect of decreased metabolizing capacity of river microorganisms exposed to FF

that we detected at this concentration for all metabolites ($p < 0.0001$).

Other literature on exposure of soil microbial communities to these ABXs exists, but it is mainly focused on analyzing changes in community structure and more partial aspects of metabolism that Biolog EcoPlates can assess. For example, in the case of SDZ, changes in soil respiration activity (Fang et al., 2014a) or in soil potential nitrification rate (PNR) and diversity of ammonium oxidizing microbes. They all detected a decrease in PNR with increasing SDZ concentrations and a reduction in the diversity of related ammonia-oxidizing microbes (Hammesfahr et al., 2011; Hou et al., 2023; Li et al., 2022; Liao et al., 2019; Radl et al., 2015). In addition, most studies are conducted by sprinkling ABX in soil samples or applying contaminated manure, which makes comparisons difficult due to differential soil composition or different doses of ABX in manure samples. For instance, in the case of SDZ, the literature indicates that it reduces the activity of soil microorganisms and causes changes in the growth and structure of the community and in its metabolism, but these studies were performed by applying ABX to soil samples (Hammesfahr et al., 2008; Liao et al., 2019; Qiu et al., 2021) or they used sulfadiazine-contaminated manure (Ding et al., 2014; Li et al., 2022; Radl et al., 2015; Xu et al., 2016). To our knowledge, only one study used soil bacterial isolates as we did (Zielezny et al., 2006), but the tests of soil respiration as well as the bacterial community structure were performed with agar diffusion tests and therefore were hardly comparable to ours. Other studies showed that high concentrations of SDZ (50 mg/kg) applied to soil induced a larger effect on the structure of the soil bacterial community as well as bacterial growth as a whole (Santas-Miguel et al., 2020; Xu et al., 2016).

In some cases, the sequenced communities were very similar to ours, with predominance of Actinobacteria and Proteobacteria (Qiu et al., 2021). Interestingly, Proteobacteria, Firmicutes and Clostridium seem to increase after exposure, while Actinobacteria and Pseudomonas seem to decrease (Ding et al., 2014; Lin et al., 2016; Qiu et al., 2021). This change in community structure may explain the disturbance in the microbial metabolic pattern that we detected after exposure to this antibiotic, especially in the case of carbohydrates. Other authors found that SDZ exposure in soil seems to promote carbohydrate metabolism, although amino acid metabolism was inhibited as in our case (Qiu et al., 2021).

The few existing studies on the effect of FF on aquatic microorganisms focused on changes in microbial community structure (Uddin et al., 2019) and point to a decrease in Actinobacteria (40% of bacteria in our samples) and Firmicutes (7%), which could explain the large decrease in bacterial metabolism we detected for this ABX as Proteobacteria appear to be more resistant (Wang et al., 2021a).There is little information on the impact on the bacterial metabolic profile produced by FF and studies focused on the effect on microorganisms associated with the nitrogen cycle (Wang et al., 2021a; Zhou et al., 2021).

The changes detected in the activity and metabolic profile of the soil microorganisms produced by NMC are consistent with the study of (Benassi-Borba et al., 2021) who found that NMC caused a significant reduction in soil enzyme activity which may be due to the loss of key microbial community members. For example, Zhang (Zhang et al., 2017) found that Pseudomonas disappear in soils treated with NMC while gammaproteobacteria were able to survive.

The effects of tetracyclines on soil microorganisms have been studied in more depth. Kong(Kong et al., 2006) found that OTC applied to soil-extracted bacteria produce a significant decrease of the AWCD and substrate utilization, but in other studies the application of the antibiotic (OTC or CTC) was done on soil, so that, again, the results are not comparable given the different characteristics of the soils (Liu et al., 2015, 2012; Ma et al., 2016; Solis et al., 2011). In general, the AWCD results showed a lower effect than direct application on bacteria, which is to be expected since in a soil substrate the exposure is necessarily lower. The effect is also less when manure contaminated with these antibiotics is applied (Chronakova et al., 2021; Fang et al., 2014b). Fang also found that Proteobacteria and Actinobacteria appear to resist CTC exposure well, although Firmicutes appear to be more sensitive. Other authors note that in fertilized soils exposed to CTC, the relative abundance of Actinobacteria and Firmicutes on antibiotic treatment increased significantly, but that of Proteobacteria decreased (Han et al., 2019). The strong impact we detected for this antibiotic on the edaphic communities studied may therefore be due to this change in the proportions of these phyla, which were predominant in our samples.

Most studies on the impacts of these ABXs on soil microbial communities also focused on more partial aspects of soil metabolism, such as the activity of soil ammonia oxidizing bacteria (Liu et al., 2020), the analysis of phospholipid fatty acids (Chen et al., 2023) and soil enzyme activities after OTC exposure. In general, high inputs of OTC and CTC decreased soil enzyme activities (about 200 mg/kg) and low and moderate inputs of OTC and CTC (e.g., 0.1 and 1 mg/Kg) had no (or very little) adverse impact on soil enzyme activities.

5. Conclusions

Our results demonstrate that five widely used veterinary antibiotics present in the environment have moderate toxicity towards non-target aquatic and terrestrial organisms, including *D. magna*, *V. fischeri*, and *A. cepa*, and very low toxicity in the case of the earthworm *E. fetida*. However, they have a deep impact on aquatic and terrestrial microorganism communities from river and soil ecosystems.

Consistent with other studies, we have observed that tetracyclines exhibit toxicity to the two aquatic indicators tested, while NMC, FF, and SDZ affect mainly *D. magna*. We have quantified, for the first time, the ecotoxicity of these ABXs on the terrestrial indicators *E. fetida* and *A. cepa*, finding that *E. fetida* survives well under exposure to concentrations >1000 μg/mL, and that NMC and CTC are the antibiotics with the highest phytotoxicity on *A. cepa* in the range of approximately 100 μg/mL.

There was evidence of the impact of some of these antibiotics on the compositions of bacterial communities, but now we have found that all five antibiotics affect the growth and metabolism of microbial communities, both aquatic and soil, within the concentration range of 0.1–10 μg/mL in a dose-dependent manner. The impact is more pronounced on soil microorganisms, and there are differences in the substrates on which the metabolic capacity of aquatic communities is lost compared to edaphic ones.

The detected environmental concentrations of these antibiotics suggest that acute ecotoxicity effects on non-target indicators belonging to different trophic levels studied are unlikely. However, at the concentrations of these ABX detected in the environment, the impact on the composition and functionality of aquatic and soil microorganism communities, which are the basis of the trophic chains, can undoubtedly cause environmental changes that should be studied in the long term.

CRediT authorship contribution statement

Cristina Gan: Data curation, Investigation. **Antonio Valenzuela:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Natalia Ferrando:** Investigation. **Guillermo Lorca:** Investigation. **Mª Rosa Pino-Otín:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Diego Ballestero:** Funding acquisition, Supervision, Validation. **Elisa Langa:** Supervision, Validation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento (Group T67_23R and CPA_08_21 grant), Cátedra NOVALTIA and Universidad San Jorge.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2024.116185.

References

Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., et al., 2018. Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. Sci. Total Environmet 626, 1295–1309.
An, J., Chen, H., Wei, S., Gu, J., 2015. Antibiotic contamination in animal manure, soil, and sewage sludge in Shenyang, northeast China. Environ. Earth Sci. 74, 5077–5086.
Andreeva, Z., Barton, D., Armour, W.J., Li, M.Y., Liao, L.-F., McKellar, H.L., et al., 2010. Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in Arabidopsis roots. Planta 232, 1263–1279.
Aydin, S., Ulvi, A., Beduk, F., Aydin, M.E., 2022. Pharmaceutical residues in digested sewage sludge: Occurrence, seasonal variation and risk assessment for soil. Sci. Total Environ. 817.
Aznar, R., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Rodriguez, J.A., Tadeo, J.L., 2014. Occurrence and analysis of selected pharmaceutical compounds in soil from Spanish agricultural fields. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 4772–4782.
Baguer, A.J., Jensen, J., Krogh, P.H., 2000. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. Chemosphere 40, 751–757.
Bai, Y., Ruan, X., Wang, F., Antoine, G., van der Hoek, J.P., 2019. Sulfonamides removal under different redox conditions and microbial response to sulfonamides stress during riverbank filtration: A laboratory column study. Chemosphere 220, 668–677.
Barbosa, M.O., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. Water Res. 94, 257–279.
Bartikova, H., Skalova, L., Stuchlikova, L., Vokral, I., Vanek, T., Podlipna, R., 2015. Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. Drug Metab. Rev. 47, 374–387.
Bastos, M.C., Soubrand, M., Le Guet, T., Le Floch, E., Joussein, E., Baudu, M., et al., 2020. Occurrence, fate and environmental risk assessment of pharmaceutical compounds in soils amended with organic wastes. Geoderma 375.
Benassi-Borba, L., Dal'Lin, C.M.P., Testolin, R.C., Batista Vieira, N.M., Tagliari Correa, C. V., Bianchi, I., et al., 2021. Assessment of phytotoxicity and impact on the enzymatic activity of soil microorganisms caused by veterinary antibiotics used in Brazilian farms. J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes 56, 675–684.
Berkner, S., Konradi, S., Schonfeld, J., 2014. Antibiotic resistance and the environment-there and back again. Embo Rep. 15, 740–744.
Bhagat, C., Kumar, M., Tyagi, V.K., Mohapatra, P.K., 2020. Proclivities for prevalence and treatment of antibiotics in the ambient water: a review. Npj Clean. Water 3.
Bialk-Bielinska A., Maszkowska J., Kolodziejska M., Steudte S., Kumirska J., Stepnowski P., et al. AQUATIC TOXICITY OF FOUR SELECTED VETERINARY DRUGS COMMONLY APPLIED IN FISH FARMING AND ANIMAL HUSBANDRY. 13th International Conference on Environmental Science and Technology (CEST), Athens, GREECE, 2013.
Bielen, A., Simatovic, A., Kosic-Vuksic, J., Senta, I., Ahel, M., Babic, S., et al., 2017. Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. Water Res. 126, 79–87.
Boxall, A.B.A., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., Levy, L.S., 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. J. Agric. Food Chem. 54, 2288–2297.
Brosche, S., Backhaus, T., 2010. Toxicity of five protein synthesis inhibiting antibiotics and their mixture to limnic bacterial communities. Aquat. Toxicol. 99, 457–465.
Caetano, M.O., Kieling, A.G., Raimondi, R.L., Gomes, L.P., Homrich Schneider, I.A., 2018. Ecotoxicity tests with Allium cepa to determine the efficiency of rice husk ash in the treatment of groundwater contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 12849–12858.
Cao, J., Ji, D., C, 2015. Interaction between earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on the degradation of oxytetracycline in soils. Soil Biol. Biochem. 90, 283–292.
Carusso, S., Juarez, A.B., Moretton, J., Magdaleno, A., 2018. Effects of three veterinary antibiotics and their binary mixtures on two green alga species. Chemosphere 194, 821–827.
Carvalho, I.T., Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. Environ. Int. 94, 736–757.
Chen, J., Zhu, B., Zhang, Y., 2023. A meta-analysis on the responses of soil microbial biomass and community structure to antibiotics. Appl. Soil Ecol. 184.
Chen, S., Zhang, W., Li, J., Yuan, M., Zhang, J., Xu, F., et al., 2020. Ecotoxicological effects of sulfonamides and fluoroquinolones and their removal by a green alga (Chlorella vulgaris) and a cyanobacterium (Chrysosporum ovalisporum). Environ. Pollut. 263.
Chronakova, A., Kyselkova, M., Elhottova, D., 2021. Common and management-specific responses of grassland soil bacterial communities to manure and chlortetracycline amendments. Eur. J. Soil Biol. 105.
De Orte, M.R., Carballeira, C., Viana, I.G., Carballeira, A., 2013. Assessing the toxicity of chemical compounds associated with marine land-based fish farms: The use of mini-scale microalgal toxicity tests. Chem. Ecol. 29, 554–563.
van der Grinten, E., Pikkemaat, M.G., van den Brandhof, E.-J., Stroomberg, G.J., Kraak, M.H.S., 2010. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. Chemosphere 80, 1–6.
Ding, G.-C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K., et al., 2014. Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. PloS One 9 e92958-e92958.
Dong, L., Gao, J., Xie, X., Zhou, Q., 2012. DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. Chemosphere 89, 44–51.
Duan, W., Cui, H., Jia, X., Huang, X., 2022. Occurrence and ecotoxicity of sulfonamides in the aquatic environment: A review. Sci. Total Environ. 820.
EMA, 2022. Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2021. European Medicines Agency. ISBN 978-92-9155-070-8 ISSN 2315-1447.
Fang, H., Han, Y., Yin, Y., Pan, X., Yu, Y., 2014a. Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil. Chemosphere 96, 51–56.
Fang, H., Han, Y.L., Yin, Y.M., Jin, X.X., Wang, S.Y., Tang, F.F., et al., 2014b. Microbial response to repeated treatments of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline in soil. J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes 49, 609–615.
Florencio, T., Carraschi, S.P., da Cruz, C., da Silva, A.F., Marques, A.M., Pitelli, R.A., 2014. Neotropical bioindicators of ecotoxicity and environmental risk of drugs with aquaculture interest. Bol. Do Inst. De. Pesca 40, 569–576.
Gao, F., Li, Z., Chang, Q., Gao, M., She, Z., Wu, J., et al., 2018. Effect of florfenicol on performance and microbial community of a sequencing batch biofilm reactor treating mariculture wastewater. Environ. Technol. 39, 363–372.
Gao, M., Qi, Y., Song, W., Zhou, Q., 2015. Biomarker analysis of combined oxytetracycline and zinc pollution in earthworms (Eisenia fetida). Chemosphere 139, 229–234.
Gao, M., Lv, M., Han, M., Song, W., Wang, D., 2016. Avoidance behavior of Eisenia fetida in oxytetracycline- and heavy metal-contaminated soils. Environ. Toxicol. Pharmacol. 47, 119–123.
Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Environ. Microbiol. 57, 2351–2359.
Giordano, R., Weber, E., Waite, J., Bencivenga, N., Krogh, P.H., Soto-Adames, F., 2010. Effect of a High Dose of Three Antibiotics on the Reproduction of a Parthenogenetic Strain of Folsomia candida (Isotomidae: Collembola). Environ. Entomol. 39, 1170–1177.
Goncalves Ferreira, C.S., Nunes, B.A., de Melo Henriques-Almeida, J.M., Guilhermino, L., 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae Tetraselmis chuii and to the crustacean Artemia parthenogenetica. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 452–458.
Gonzalez-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganes, F., Rosal, R., Boltes, K., et al., 2013. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. Water Res. 47, 2050–2064.
Grossman, T.H., 2016. Tetracycline antibiotics and resistance. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6 (4), a025387.
Guo, F., Wang, Y., Peng, J., Huang, H., Tu, X., Zhao, H., et al., 2022. Occurrence, Distribution, and Risk Assessment of Antibiotics in the Aquatic Environment of the Karst Plateau Wetland of Yangtze River Basin, Southwestern China. Int. J. Environ. Res. Public Health 19.
Guo, R.X., Chen, J.Q., 2012. Phytoplankton toxicity of the antibiotic chlortetracycline and its UV light degradation products. Chemosphere 87, 1254–1259.
Haenelt, S., Wang, G., Kasmanas, J.C., Musat, F., Richnow, H.H., da Rocha, U.N., et al., 2023. The fate of sulfonamide resistance genes and anthropogenic pollution marker intI1 after discharge of wastewater into a pristine river stream. Front. Microbiol. 14.
Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla, K., Thiele-Bruhn, S., 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. Soil Biol. Biochem. 40, 1583–1591.
Hammesfahr, U., Kotzerke, A., Lamshoeft, M., Wilke, B.-M., Kandeler, E., Thiele-Bruhn, S., 2011. Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community. Eur. J. Soil Biol. 47, 61–68.
Han, L., Zhang, H., Long, Z., Ge, Q., Mei, J., Yu, Y., et al., 2019. Exploring microbial community structure and biological function in manured soil during ten repeated treatments with chlortetracycline and ciprofloxacin. Chemosphere 228, 469–477.
Hao, H.H., Cheng, G.Y., Iqbal, Z., Ai, X.H., Hussain, H.I., Huang, L.L., et al., 2014. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. Front. Microbiol. 5.
Harnisz, M., Korzeniewska, E., Golas, I., 2015. The impact of a freshwater fish farm on the community of tetracycline-resistant bacteria and the structure of tetracycline resistance genes in river water. Chemosphere 128, 134–141.
Harrabi, M., Alexandrino, D.A.M., Aloulou, F., Elleuch, B., Liu, B., Jia, Z.J., et al., 2019b. Biodegradation of oxytetracycline and enrofloxacin by autochthonous microbial communities from estuarine sediments. Sci. Total Environ. 648, 962–972.

Harrabi, M., Alexandrino, D.A.M., Aloulou, F., Elleuch, B., Liu, B., Jia, Z., et al., 2019a. Biodegradation of oxytetracycline and enrofloxacin by autochthonous microbial communities from estuarine sediments. Sci. Total Environ. 648, 962–972.
Hernando, M.D., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A.R., Barcelo, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. Talanta 69, 334–342.
Hou, G., Wazir, Z.G., Liu, J., Wang, G., Rong, F., Xu, Y., et al., 2023. Effects of sulfadiazine and Cu on soil potential nitrification and ammonia-oxidizing archaea and bacteria communities across different soils. Front. Microbiol. 14.
Hu, Z.D., Fan, Z.J., Song, Q.X., Khatoon, R., Zhang, M., Wang, N., et al., 2021. The Effect of Exogenous Oxytetracycline on High-Temperature Anaerobic Digestion of Elements in Swine Wastewater. Water 13.
Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Sci. Total Environ. 346, 87–98.
Jara, B., Tucca, F., Srain, B.M., Mejanelle, L., Aranda, M., Fernandez, C., et al., 2021. Antibiotics florfenicol and flumequine in the water column and sediments of Puyuhuapi Fjord, Chilean Patagonia. Chemosphere 275.
Ji, K., Kim, S., Han, S., Seo, J., Lee, S., Park, Y., et al., 2012a. Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe? Ecotoxicology 21, 2031–2050.
Ji, X.L., Shen, Q.H., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y.L., et al., 2012b. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. J. Hazard. Mater. 235, 178–185.
Jiang, Y.H., Li, M.X., Guo, C.S., An, D., Xu, J., Zhang, Y., et al., 2014. Distribution and ecological risk of antibiotics in a typical effluent-receiving river (Wangyang River) in north China. Chemosphere 112, 267–274.
Jin, C.X., Chen, Q.Y., Sun, R.L., Zhou, Q.X., Liu, J.J., 2009. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato. Ecotoxicology 18, 878–885.
Kadlec, K., Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2007. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in Bordetella bronchiseptica: identification of a novel chloramphenicol exporter. J. Antimicrob. Chemother. 59, 191–196.
Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Sci. Total Environ. 361, 196–207.
Kim, H.J., Lee, S.H., Hong, Y.K., Chul, K.S., 2018. Effect of Veterinary Antibiotics on the Growth of Lettuce. Korean J. Soil Sci. Fertil. 51, 119–127.
Kim, K.R., Owens, G., Ok, Y.S., Park, W.K., Lee, D.B., Kwon, S.I., 2012. Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting. Waste Manag. 32, 110–116.
Klein, E.Y., Van Boeckel, T.P., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., et al., 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115, E3463–E3470.
Kobayashi, Y., Ohshiro, N., Sakai, R., Ohbayashi, M., Kohyama, N., Yamamoto, T., 2005. Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 SLC22A7. J. Pharm. Pharmacol. 57, 573–578.
Kolar, B., Arnus, L., Jeretin, B., Gutmaher, A., Drobne, D., Durjava, M.K., 2014. The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. Chemosphere 115, 75–80.
Kolodziejska, M., Maszkowska, J., Bialk-Bielinska, A., Steudte, S., Kumirska, J., Stepnowski, P., et al., 2013. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. Chemosphere 92, 1253–1259.
Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., et al., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environ. Sci. Technol. 36, 1202–1211.
Kong, W.D., Zhu, Y.G., Fu, B.J., Marschner, P., He, J.Z., 2006. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. Environ. Pollut. 143, 129–137.
Kong, W.D., Zhu, Y.G., Liang, Y.C., Zhang, J., Smith, F.A., Yang, A., 2007. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (Medicago sativa L.). Environ. Pollut. 147, 187–193.
Korkmaz, N.E., Savun-Hekimoglu, B., Aksu, A., Burak, S., Caglar, N.B., 2022. Occurrence, sources and environmental risk assessment of pharmaceuticals in the Sea of Marmara, Turkey. Sci. Total Environ. 819.
Kotzerke, A., Klemer, S., Kleineidam, K., Horn, M.A., Drake, H.L., Schloter, M., et al., 2010. Manure contaminated with the antibiotic sulfadiazine impairs the abundance of nirK- and nirS-type denitrifiers in the gut of the earthworm Eisenia fetida. Biol. Fertil. Soils 46, 415–418.
Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T.J., Marsalek, B., Feng, M., Sharma, V.K., 2020. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. Chemosphere 251.
Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, S.K., Chander, Y., Rosen, C.J., 2005. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. J. Environ. Qual. 34, 2082–2085.
Kummerer, K., 2010. Pharmaceuticals in the Environment (In: Gadgil A, Liverman DM, editors). Annu. Rev. Environ. Resour. Vol 35 (35), 57.
Lai, H.-T., Hou, J.-H., Su, C.-I., Chen, C.-L., 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae Chlorella pyrenoidosa, Isochrysis galbana, and Tetraselmis chui. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 329–334.
Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. Chemosphere 54, 661–668.
Lee, S., Kim, C., Liu, X., Lee, S., Kho, Y., Kim, W.-K., et al., 2021. Ecological Risk Assessment of Amoxicillin, Enrofloxacin, and Neomycin: Are Their Current Levels in the Freshwater Environment Safe? Toxics 9.
Li, J., Yang, H., Qin, K., Wei, L., Xia, X., Zhu, F., et al., 2022. Effect of pig manure-derived sulfadiazine on species distribution and bioactivities of soil ammonia-oxidizing microorganisms after fertilization. J. Hazard. Mater. 423.
Li, P.Z., Zhu, T.Y., Zhou, D.Y., Lu, W., Liu, H.M., Sun, Z.W., et al., 2020. Analysis of Resistance to Florfenicol and the Related Mechanism of Dissemination in Different Animal-Derived Bacteria. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10.
Liao, Q., Li, M., Dong, Y., Wu, M., Meng, Z., Zhang, Q., et al., 2019. Impacts of Cu and sulfadiazine on soil potential nitrification and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria. Environ. Pollut. Bioavailab. 31, 60–69.
Lin, D., Zhou, Q., Xu, Y., Chen, C., Li, Y., 2012. Physiological and molecular responses of the earthworm (Eisenia fetida) to soil chlortetracycline contamination. Environ. Pollut. 171, 46–51.
Lin, H., Jin, D., Freitag, T.E., Sun, W., Yu, Q., Fu, J., et al., 2016. A compositional shift in the soil microbiome induced by tetracycline, sulfamonomethoxine and ciprofloxacin entering a plant-soil system. Environ. Pollut. 212, 440–448.
Lin, T., Yu, S.L., Chen, Y.Q., Chen, W., 2014. Integrated biomarker responses in zebrafish exposed to sulfonamides. Environ. Toxicol. Pharmacol. 38, 444–452.
Liu, B., Li, Y., Zhang, X., Wang, J., Gao, M., 2015. Effects of chlortetracycline on soil microbial communities: Comparisons of enzyme activities to the functional diversity via Biolog EcoPlates (TM). Eur. J. Soil Biol. 68, 69–76.
Liu, F., Wu, J., Ying, G.-G., Luo, Z., Feng, H., 2012. Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. Appl. Microbiol. Biotechnol. 95, 1615–1623.
Liu, M., Cao, J., Wang, C., 2020. Bioremediation by earthworms on soil microbial diversity and partial nitrification processes in oxytetracycline-contaminated soil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 189.
Loos, R., Carvalho, R., Antonio, D.C., Cornero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., et al., 2013. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. Water Res. 47, 6475–6487.
Lourido, M., Peluso, J., Aronzon, C.M., 2022. Lethal and sublethal effects of the emerging contaminant oxytetracycline on the embryo-larval development of Rhinella arenarum. Environ. Toxicol. Pharmacol. 89.
Lovern, S.B., Van Hart, R., 2022. Impact of oxytetracycline exposure on the digestive system microbiota of Daphnia magna. Plos One 17.
Luis Martinez, J., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ. Pollut. 157, 2893–2902.
Lulijwa, R., Rupia, E.J., Alfaro, A.C., 2020. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. Rev. Aquac. 12, 640–663.
Ma, T., Pan, X., Chen, Lk, Liu, W., Christie, P., Luo, Y., et al., 2016. Effects of different concentrations and application frequencies of oxytetracycline on soil enzyme activities and microbial community diversity. Eur. J. Soil Biol. 76, 53–60.
Machado, A.A., Americo-Pinheiro, J.H.P., Carraschi, S.P., Cruz, C., Machado-Neto, J.G., 2016. Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline antibiotc for tilapia (Oreochromis niloticus), Daphnia magna, and Lemna minor. Arq. Bras. De. Med. Vet. E Zootec. 68, 1244–1250.
Magdaleno, A., Carusso, S., Moretton, J., 2017. Toxicity and Genotoxicity of Three Antimicrobials Commonly Used in Veterinary Medicine. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 99, 315–320.
Martins, J., Teles, L.O., Vasconcelos, V., 2007. Assays with Daphnia magna and Danio rerio as alert systems in aquatic toxicology. Environ. Int. 33, 414–425.
Mattioli, C.C., Chiste, B.M., Takeshita, N.A., Jonsson, C.M., Ferracini, V.L., Hisano, H., 2020. Acute Toxicity and Risk Assessment of Florfenicol for Nile Tilapia Larvae. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 105, 721–727.
Mayor, D.J., Solan, M., Martinez, I., Murray, L., McMillan, H., Paton, G.I., et al., 2008. Acute toxicity of some treatments commonly used by the salmonid aquaculture industry to Corophium volutator and Hediste diversicolor: Whole sediment bioassay tests. Aquaculture 285, 102–108.
Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., et al., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. Water Res. 47, 957–995.
Moldovan, Z., 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. Chemosphere 64, 1808–1817.
National Center for Biotechnology Information. PubChem Identifier: CID 54680782. 2023a ⟨https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54680782⟩.
National Center for Biotechnology Information. PubChem Identifier: CID 55694. 2023b ⟨https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neomycin#section=Solubility⟩.
Ngigi, A.N., Magu, M.M., Muendo, B.M., 2020. Occurrence of antibiotics residues in hospital wastewater, wastewater treatment plant, and in surface water in Nairobi County, Kenya. Environ. Monit. Assess. 192.
Norr, C., Riepert, F., 2007. Bioaccumulation studies with Elsenia fetida using an established degradation test system. J. Soils Sediment. 7, 393–397.
Oliver, J.P., Gooch, C.A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J.J., Sassoubre, L., et al., 2020. Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. J. Dairy Sci. 103, 1051–1071.
Omuferen, L.O., Maseko, B., Olowoyo, J.O., 2022. Occurrence of antibiotics in wastewater from hospital and convectional wastewater treatment plants and their impact on the effluent receiving rivers: current knowledge between 2010 and 2019. Environ. Monit. Assess. 194.
Park, S., Choi, K., 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. Ecotoxicology 17, 526–538.

Patil, H.J., Gatica, J., Zolti, A., Benet-Perelberg, A., Naor, A., Dror, B., et al., 2020. Temporal Resistome and Microbial Community Dynamics in an Intensive Aquaculture Facility with Prophylactic Antimicrobial Treatment. Microorganisms 8.
Peleg, M., Corradini, M.G., Normand, M.D., 2007. The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. Food Res. Int. 40, 808–818.
Pino, M.R., Val, J., Mainar, A.M., Zuriaga, E., Espanol, C., Langa, E., 2015. Acute toxicological effects on the earthworm Eisenia fetida of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. Sci. Total Environ. 518, 225–237.
Pino-Otin, M.R., Muniz, S., Val, J., Navarro, E., 2017. Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. Sci. Total Environ. 595, 441–450.
Pino-Otin, M.R., Langa, E., Val, J., Mainar, A.M., Ballestero, D., 2021. Impact of citronellol on river and soil environments using non-target model organisms and natural populations. J. Environ. Manag. 287.
Pino-Otin, M.R., Ferrando, N., Ballestero, D., Langa, E., Roig, F.J., Terrado, E.M., 2022. Impact of eight widely consumed antibiotics on the growth and physiological profile of natural soil microbial communities. Chemosphere 305.
Pohland, B., Owen, B., 2009. A language and environment for statistical computing, 1. R Core Team, pp. 1–3.
Qiu, L., Daniell, T.J., Banwart, S.A., Nafees, M., Wu, J., Du, W., et al., 2021. Insights into the mechanism of the interference of sulfadiazine on soil microbial community and function. J. Hazard. Mater. 419.
Quaik, S., Embrandiri, A., Ravindran, B., Hossain, K., Al-Dhabi, N.A., Arasu, M.V., et al., 2020. Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries. J. King Saud. Univ. Sci. 32, 1300–1305.
Radl, V., Kindler, R., Welzl, G., Albert, A., Wilke, B.-M., Amelung, W., et al., 2015. Drying and rewetting events change the response pattern of nitrifiers but not of denitrifiers to the application of manure containing antibiotic in soil. Appl. Soil Ecol. 95, 99–106.
Reggiani, R., Laoreti, P., 2000. Evidence for the involvement of phospholipase C in the anaerobic signal transduction. Plant Cell Physiol. 41, 1392–1396.
Robinson, T.P., Bu, D.P., Carrique-Mas, J., Fevre, E.M., Gilbert, M., Grace, D., et al., 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 110, 377–380.
Rosa Pino-Otin, M., Val, J., Ballestero, D., Navarro, E., Sanchez, E., Mainar, A.M., 2019. Impact of Artemisia absinthium hydrolate extracts with nematicidal activity on non-target soil organisms of different trophic levels. Ecotoxicol. Environ. Saf. 180, 565–574.
Saha, T., Biswas, A., Chakraborty, R., 2021. Subinhibitory Levels of Oxytetracycline in Earthworm Meal Significantly Boost Resistance-Mutation Rates in Bacillus spp. within the Gut of Eisenia fetida. J. Pharm. Res. Int. 33, 80–87.
Santas-Miguel, V., Rodriguez-Gonzalez, L., Nunez-Delgado, A., Diaz-Ravina, M., Arias-Estevez, M., Fernandez-Calvino, D., 2020. The Toxicity Exerted by the Antibiotic Sulfadiazine on the Growth of Soil Bacterial Communities May Increase over Time. Int. J. Environ. Res. Public Health 17.
Siedlewicz, G., Zak, A., Sharma, L., Kosakowska, A., Pazdro, K., 2020. Effects of oxytetracycline on growth and chlorophyll a fluorescence in green algae (Chlorella vulgaris), diatom (Phaeodactylum tricornutum) and cyanobacteria (Microcystis aeruginosa and Nodularia spumigena). Oceanologia 62, 214–225.
Solis, Y., Chavarria, G., Garcia, F., Rodriguez, C., 2011. Exposure of a tropical soil to mg/kg of oxytetracycline elicits hormetic responses in the catabolic activities of its microbial community. Dose-Response 9, 434–441.
Stone, J.J., Dreis, E.K., Lupo, C.D., Clay, S.A., 2011. Land application of tylosin and chlortetracycline swine manure: Impacts to soil nutrients and soil microbial community structure. J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes 46, 752–762.
Su, D., Ben, W., Strobel, B.W., Qiang, Z., 2020. Occurrence, source estimation and risk assessment of pharmaceuticals in the Chaobai River characterized by adjacent land use. Sci. Total Environ. 712.
Suga, N., Ogo, M., Suzuki, S., 2013. Risk assessment of oxytetracycline in water phase to major sediment bacterial community: A water-sediment microcosm study. Environ. Toxicol. Pharmacol. 36, 142–148.
Thanassi, D.G., Suh, G.S.B., Nikaido, H., 1995. Role of outer-membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of escherichia-coli. J. Bacteriol. 177, 998–1007.
Uddin, M., Chen, J., Qiao, X., Tian, R., Arafat, Y., Yang, X., 2019. Bacterial community variations in paddy soils induced by application of veterinary antibiotics in plant-soil systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 167, 44–53.
Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., et al., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 5649–5654.
Wang, J., Han, J.Z., 2008. Effects of heavy metals and antibiotics on soil and vegetables. Ecology and Rural. Environment 24 (4), 90–93.
Wang, M., Wu, J., Zhou, T., Liang, Y., Zheng, L., Sun, Y., 2021a. Effects of copper and florfenicol on nirS- and nirK-type denitrifier communities and related antibiotic resistance in vegetable soils. Ecotoxicol. Environ. Saf. 213.
Wang, R.M., Ji, M., Zhai, H.Y., Guo, Y.J., Liu, Y., 2021b. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in WWTP effluent-receiving water bodies and reclaimed wastewater treatment plants. Sci. Total Environ. 796.
Wang, S., Wang, Z., Chen, M.D., Fang, H., Wang, D.G., 2017. Co-exposure of Freshwater Microalgae to Tetrabromobisphenol A and Sulfadiazine: Oxidative Stress Biomarker Responses and Joint Toxicity Prediction. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 99, 438–444.
Wang, X.J., Wang, Y.J., Nian, J.W., Liu, S.W., Zhang, Y.H., Xia, Y.S., et al., 2022. Accumulation and distribution of oxytetracycline and chlortetracycline in tobacco seedlings and their effects on growth. J. Anim. Plant Sci. -Jpn. 32, 746–752.
Wang, Y., Wu, S., Chen, L., Wu, C., Yu, R., Wang, Q., Zhao, X., 2012. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm Eisenia fetida. Chemosphere 88, 484–491.
Wieczerzak, M., Kodlak, B., Namiesnik, J., 2018. Impact of selected drugs and their binary mixtures on the germination of Sorghum bicolor (sorgo) seeds. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 18717–18727.
Wilson, G.B., 1950. Cytological effects of some antibiotics. J. Hered. 41, 227–231.
Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K.O., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna. Chemosphere 40, 723–730.
Wu, Q., Pan, C.-G., Wang, Y.-H., Xiao, S.-K., Yu, K.-F., 2021. Antibiotics in a subtropical food web from the Beibu Gulf, South China: Occurrence, bioaccumulation and trophic transfer. Sci. Total Environ. 751.
Xie, X., Zhou, Q., He, Z., Bao, Y., PHYSIOLOGICAL, A.N.D., 2010. Potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (Triticum aestivum L.). Environ. Toxicol. Chem. 29, 922–928.
Xie, Z., Tang, J., Wu, X., Fan, S., Cheng, H., Li, X., et al., 2019. Bioconcentration and ecotoxicity of sulfadiazine in the aquatic midge Chironomus riparius. Environ. Toxicol. Pharmacol. 66, 69–74.
Xu, Y., Yu, W., Ma, Q., Wang, J., Zhou, H., Jiang, C., 2016. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 134, 43–52.
Yang, S., Lu, C., Qin, C., Lu, C., Pan, Z., Zhao, L., et al., 2023. Mitigation effects and microbial mechanism of two ecological earthworms on the uptake of chlortetracycline and antibiotic resistance genes in lettuce. Sci. Total Environ. 885.
Yao, J.H., Niu, D.K., Li, Z.J., Liang, Y.C., Zhang, S.Q., 2010. Effects of antibiotics oxytetracycline on soil enzyme activities and microbial biomass in wheat rhizosphere. Sci. Agric. Sin. 43 (4), 721–728.
Yin, F., Dong, H., Zhang, W., Zhu, Z., Shang, B., 2018. Antibiotic degradation and microbial community structures during acidification and methanogenesis of swine manure containing chlortetracycline or oxytetracycline. Bioresour. Technol. 250, 247–255.
Zhang, Q., Kang, O., Jabeen, S., Dick, W.A., 2017. Alterations in soil microbial communities caused by treatments with penicillin or neomycin. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 18651–18662.
Zhang, T., Ding, Y., Peng, J., Dai, Y., Luo, S., Liu, W., et al., 2022. Effects of Broad-Spectrum Antibiotic (Florfenicol) on Resistance Genes and Bacterial Community Structure of Water and Sediments in an Aquatic Microcosm Model. Antibiotics 11.
Zhao, H., Shi, S., Zhao, H., Guo, J., Yang, Z., Gao, H., et al., 2019. Proteomic analysis of the earthworm Eisenia fetida exposed to oxytetracycline in soil. RSC Adv. 9, 41628–41638.
Zhou, Q., Xie, X., Feng, F., Huang, S., Sun, Y., 2021. Impact of acyl-homoserine lactones on the response of nitrogen cycling in sediment to florfenicol stress. Sci. Total Environ. 785.
Zhou, Z., Zhang, Z., Feng, L., Zhang, J., Li, Y., Lu, T., et al., 2020. Adverse effects of levo floxacin and oxytetracycline on aquatic microbial communities. Sci. Total Environ. 734.
Zielezny, Y., Groeneweg, J., Vereecken, H., Tappe, W., 2006. Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. Soil Biol. Biochem. 38, 2372–2380.
Zounkova, R., Kliemesova, Z., Nepejchalova, L., Hilscherova, K., Blaha, L., 2011. Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. Environ. Toxicol. Chem. 30, 1184–1189.

Anexo 1.2:

Antibiótico	*D. magna* (µg/mL)	*A. fischeri* (µg/mL)	*E. fetida* (mg/Kg)	*A. cepa* (µg/mL)	Comunidad microbiana agua (µg/mL)	Comunidad microbiana suelo (µg/mL)
	LC_{50} (24h)	EC_{50} (30´)	LC_{50} (14 d)	EC_{50} (72h)	LC_{50} (168h)	LC_{50} (168h)
Ampicilina	4324.13 [1] (3549.97-5312.77)	363.52[8] (302.61-435.65)	>1000	>300	-	-
Amoxicilina	>2500[2]	>1500	>1000	45.19 (35.11-59.37)	-	-
Cloranfenicol	285.63[3] (235.12-333.92)	197.25 (171.57-225.51)	>1000	102.34 (84.09-126.42	-	-
Eritromicina	498.72[4] (405.55-608.40)	294.84[9] (278.52-312.05)	>1000	>300	-	-
Estreptomicina	772.37[5] (499.27-1087.04)	>5000[10]	>1000	>300	-	-
Gentamicina	840.75[6] (742.70-927.24)	>5000[11]	>1000	42.57 (30.74-61.07)	-	-
Penicilina G	>2500	84.29 (74.29-95.09)	>1000	>300	-	-
Tetraciclina	391.07[7] (352.71-430.33)	-*[12]	>1000[13]	106.58 (82.33-141.47)	-	-

** Dato no obtenido por incompatibilidad con el método utilizado*
Elaboración propia.

(1) LC_{50} (24h) = >1000 (Park and Choi 2008b)
(2) LC_{50} (24h) = >1000 (Park and Choi 2008b)
(3) LC_{50} (24h) = 1086 (Calleja, Persoone and Geladi 1994)
542.86 (Lilius et al. 1994)
(4) LC_{50} (24h) = 387.70 (282.5-532.0) (Delupis et al. 1992)
22.45 (16.98-29.85) (Isidori et al. 2005)
(5) LC_{50} (24h) = 947 (778-1181) (Wollenberger et al. 2000)
(6) LC_{50} (24h) = 875.5±180 (Lomba et al. 2020)
(7) LC_{50} (24h) = >340 (Wollenberger et al. 2000)

(8) LC_{50} (30') = >50 (Iolele et al. 2015)
(9) LC_{50} (30') = >100 (Isidori et al. 2005)
(10) LC_{50} (30') = >0.4 (Van der Grinter et al. 2010)
(11) LC_{50} (30') = >10000 (Lomba et al. 2020)
(12) LC_{50} (30') = 6.7 (Havelkova et al. 2016)

(13) LC_{50} (14d) = >2000 (Pino et al. 2015)

Anexo 1.3

Propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua y suelo empleadas

Tipo de ecosistema	Parámetro analizado	Resultado	
Acuático	Temperatura del agua (ºC)	17	
	pH	7.5	
	Conductividad eléctrica (mS)	2.8	
		Suelo superficial	**Suelo 30 cm de profundidad**
Terrestre	Contenido de arcilla (%)	20.98	23.61
	Contenido de arena (%)	16.08	13.10
	Contenido de limo (%)	62.94	63.29
	pH	7.9±0.5	8.1±0.5
	K (mg/L)	238±40	208±35
	Mg (mg/Kg)	244±39	242±39
	P Oslen (mg/Kg)	13±2	10±1.7
	$EC_{1:5}$ (dS/m)	0.6±0.09	0.4±0.06
	Materia orgánica (g/100g)	2.46±0.31	2.35±0.30

Anexos BLOQUE II

Anexo 2.1

Heliyon 11 (2025) e43932

Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

journal homepage: www.cell.com/heliyon

Research article

Terpineol enhances antibiotic effectiveness and reduces resistance in clinically relevant bacteria

Antonio Valenzuela, Cristina Gan, Natalia Ferrando, Elisa Langa, Diego Ballestero, María Rosa Pino-Otín *

Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, 50830, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Terpineol
Synergy
Antibiotics
Antimicrobial activity
Terpenes
Antimicrobial resistance

ABSTRACT

Background and aim: The synergistic interaction between natural compounds and existing antibiotics (ABXs) offers a promising strategy to enhance ABX efficacy while mitigating resistance. This study evaluated the potential of terpineol (TER), a monocyclic monoterpene of plant origin with antimicrobial properties, as an enhancer of antibiotic activity against 14 clinically and veterinary relevant bacterial strains, including ESKAPE pathogens identified by WHO as urgent targets.

Experimental procedure: The antimicrobial activity of TER and its synergistic effects with 13 commonly used antibiotics were assessed using the checkerboard microdilution method and isobologram representation, with growth kinetics and time-kill curves generated over 24 h.

Key results: TER showed antimicrobial activity against 14 tested bacteria. The lowest MIC was 0.25 mg/mL for *Acinetobacter baumannii* (WHO priority 1). TER was effective (MIC = 0.5 mg/mL) against various Gram-negative and positive bacteria, exhibiting bactericidal activity in all cases. TER formed additive and synergistic relationships with 11 antibiotics. Six combinations demonstrated synergy (FICi≤0.5), 24 showed additivity (0.5<FICi≤1), and 13 exhibited indifference (1<FICi<4), with no antagonism (FICi≥4). The six TER/ABX synergies resulted in 100 % inhibition of bacterial growth, reducing MICs by up to 87.5 %. For the first time, this study demonstrated that TER minimally generates microbial resistance compared to commercial antibiotics. Additionally, TER acted as an Antimicrobial Resistance Modifying Agent, reducing resistance to four ABXs (gentamycin, florfenicol, chloramphenicol, tetracycline) in both Gram-positive and negative bacteria.

Conclusions and implications: Given its safety profile endorsed by EPA and FDA, TER emerges as a promising candidate for natural antibiotic enhancement, preventing the development of resistance.

Abbreviations: ABX, antibiotic; EO, essential oil; MIC, minimum inhibitory concentration; TER, terpineol.

* Corresponding author. Universidad San Jorge, Campus Universitario Villanueva de Gállego, Autovía A- 23 Zaragoza-Huesca, km. 510, 50830, Villanueva de Gállego, Zaragoza, Spain. www.usj.es

E-mail addresses: avalenzuela@usj.es (A. Valenzuela), cgan@usj.es (C. Gan), nferrando@usj.es (N. Ferrando), elanga@usj.es (E. Langa), dballestero@usj.es (D. Ballestero), rpino@usj.es (M.R. Pino-Otín).

https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e43932
Received 24 July 2024; Received in revised form 9 July 2025; Accepted 24 September 2025
Available online 29 September 2025
2405-8440/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

Antibiotics (ABXs) have been one of the most successful therapies for the control of infectious diseases and have prevented millions of deaths. However, their enormous consumption, which has been increasing in recent decades [1], has led to the growing emergence of antibiotic-resistant bacteria, which has become a major public health problem [2,3].

The synergistic interaction between natural compounds and existing ABXs offers a promising alternative to reduce the minimum inhibitory concentration (MIC) of these ABXs, which is expected to help mitigate resistance by lowering overall antibiotic use [4,5]. Moreover, the distinct mechanisms of action of natural products compared to synthetic ABXs could significantly contribute to this effect [6].

Terpineols ($C_{10}H_{18}O$) are monocyclic monoterpene tertiary alcohols of plant origin. They can be found in hundreds of plant sources, including oils, herbs, leaves, fruits, or flowers, including plants grown for other industrial uses such as *Pinus pinaster* A. or *Origanum majorana* L. [7]. Additionally, terpineols are commonly used as ingredient in industrial products such as cosmetics, perfumes or aromatic scents [8].

Five common isomers of terpineol, alpha-, beta-, gamma-, delta- and terpinen-4-ol can be found. α-terpineol and its isomer terpinen-4-ol are the most commonly found in nature [8]. These isomers have shown antimicrobial activity, with MICs ranging from 0.75 to 1.5 mg/L when tested as isolated compounds [9] and antibacterial and antifungal activity when being part of an essential oil (EO) [10].

All these properties make terpineol (TER) a good candidate as a synergist or enhancer of other antibacterial agents. In fact, terpineol-rich EOs have shown synergistic effects when combined with ABXs, for example with vancomycin against *Clostridioides difficile* [11] or with cefixime against *Klebsiella pneumoniae* [12]. To our knowledge no study has ever been performed with pure TER, to systematically elucidate the possible combined use of this natural product.

The aim of this study was to evaluate whether the synergies between TER and ABXs can be a viable alternative to commercial antibiotics by enhancing antimicrobial efficacy while reducing the development of resistance. To achieve this, we aimed to: (1) assess the synergistic potential of various combinations of TER with 13 commonly utilized commercial ABXs against 14 clinically and veterinary relevant Gram-positive and Gram-negative bacteria. (2) quantify the observed synergies and evaluate their impact on microbial growth kinetics; and (3) analyze whether the synergy of ABX + TER at sub-MIC concentrations, generates less resistance compared to ABX alone applied at sub-MIC concentration.

2. Material and methods

2.1. Antimicrobials and solvents

TER used in this study is a mixture of isomers: 61.8 % of alfa-terpineol, 11.8 % of beta-terpineol and 18.7 % of gamma-terpineol. Its characteristics, as well as those of the 13 selected ABXs and the solvents used to prepare TER solutions, are shown in Table 1. The effect of the selected solvent concentrations was examined alone in preliminary tests to ensure that they are not harmful to the microorganisms. ABXs solutions were made using distilled water (SIEMENS Ultra Clear™). pH of every stock solution was measured to ensure adequate growth conditions with a FiveEasy F20 pHmeter.

Table 1
Main properties of antimicrobials.

Antibiotic/Natural product	Abbreviation	CAS number	Family	Purity	Supplier	Molecular weight (g/mol)
Terpineol	TER	8000-41-7	Terpenes	Andhydrous*	Sigma-Aldrich	154.3
Amoxicillin	AMO	26787-78-0	Beta-lactams	96–102 %	Sigma-Aldrich	365.4
Ampicillin	AMP	69-53-4		≥90 %	Sigma-Aldrich	394.4
Penicillin G	PEN	69-57-8		96–102 %	Sigma-Aldrich	356.4
Gentamycin	GTM	1403-66-3	Aminoglycosides	≥97 %	Acofarma	447.6
Streptomycin	STM	57-92-1		≥97 %	Acofarma	581.6
Neomycin	NMC	1404-04-2		–	Laboratorios Karizoo, S.A.	614.6
Chloramphenicol	CHL	56-75-7	Amphenicols	97.5 %	Acofarma	323.1
Florfenicol	FF	73231-34-2		–	Laboratorios Karizoo, S.A.	358.2
Erythromycin	ERY	114-07-8	Macrolides	95.9 %	Acofarma	733.9
Tetracycline	TC	64-75-5	Tetracyclines	99.2 %	Acofarma	444.4
Chlortetracycline	CTC	57-62-5		>99 %	Sigma-Aldrich	478.9
Oxytetracycline	OTC	2058-46-0		>99 %	Sigma-Aldrich	496.9
Sulfadiazine	SDZ	68-35-9	Sulfonamides	>99 %	Acofarma	250.3
Dimetilsulfoxide	DMSO	67-68-5	–	≥99.7 %	Sigma-Aldrich	78.1
Tween 20™	T20	9005-64-5	–	≥40 %	Sigma-Aldrich	1227.5
Tween 80™	T80	9005-65-6	–	≥58 %	Sigma-Aldrich	1310.0

* 61.8 % of alpha-terpineol, 11.8 % of beta-terpineol and 18.7 % of gamma-terpineol

2.2. Microorganisms

Bacterial strains used in this study include 5 Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 and *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386) and 9 Gram-negative bacteria (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Pasteurella aerogenes* ATCC 27883, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 and *Serratia marcescens* ATCC 13880). Additionally, one fungal strain (Candida albicans ATCC 10231) was included in this study.

All microorganisms were procured from Thermo Scientific as freeze-dried Culti-loops™ bacteria, rehydrated, and subsequently preserved at −80 °C in cryovials (Deltalab S.L. Barcelona, Spain) until employed. Culture conditions including medium and temperature were established according the guidelines specified by ATCC for each strain (Support Information: Table A.1).

2.3. Determination of antimicrobial properties

All procedures were conducted under sterile conditions within a class II laminar flow biological safety hood (Model MSC Advantage 1.2).

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) for each compound followed the standard broth microdilution method as per the guidelines outlined by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M07-A9 2018) and ISO 207776-1 (2019) for bacteria and (CLSI, M27-A23, 2017) for yeast. Briefly, 96-well round-bottom microplates (Deltalab S.L.) containing 100 μL of the specific medium for each microorganism (refer to S.I. 1) were prepared with 100 μL of a serial dilution of TER and ABXs.

Subsequently, these plates were inoculated with 10 μL of an overnight bacterial suspension or a 48-h yeast suspension, adjusted to McFarland standard optical density to achieve an approximate bacterial and yeast concentration of $5{\cdot}10^8$ and $1{\cdot}10^6$ CFU/mL respectively, using a BioTek™ Synergy H1 Hybrid multimode microplate reader. Each experiment included a positive control for bacterial growth and a negative control for sterility. The plates were then incubated for 24 h in an Incuterm bacteriological culture incubator (Trade Raypa®), after which the absorbance of each well was measured using the same microplate reader. The MIC value was determined as the lowest concentration of the tested compounds at which the absorbance was similar to the negative control of the plate, in accordance with CLSI guideline M07-A9 (2018).

Afterwards, 10 μL from wells starting from the highest concentration tested to the MIC concentration were inoculated onto agar plates and incubated. The minimum bactericidal concentration (MBC) was considered the lowest concentration at which no growth was observed. The bacteriostatic or bactericidal effect of the compounds was determined by assessing the MBC/MIC ratio, considering bactericidal effects when MBC/MIC $\leq$4 [13].

2.4. Determination of synergies

Combinative effect of TER and ABXs was studied using the checkboard microdilution method followed by the isobologram representation [14]. The chosen TER stock solution for the synergic study was the one with the lowest MIC value. In cases where more than one solution has the same MIC for the same bacterium, DMSO solutions were selected preferably. Moreover, ABXs solutions studied were limited to those which MIC obtained previously was higher than 0.01 mg/mL.

For the microdilution checkerboard test, TER was diluted in a series horizontally, while the ABXs was diluted in a series vertically in microplates containing the appropriate bacterial culture medium. The plates were then inoculated and incubated following the procedures described in Section 2.4.

The description of the type of interaction between TER and ABXs was carried out calculating the Fractional Inhibitory Concentration index (FICi) for every combination tested as follows [15,16]:

$$FICi\ index = FIC\ natural\ product\ (NP) + FIC\ ABX = \frac{MIC_{NP,ABX}}{MIC_{NP}} + \frac{MIC_{ABX,NP}}{MIC_{ABX}} \quad \text{Equation 1}$$

Following this equation synergy effect is defined when FICi $\leq$0.5; additive effect when FICi index is between 0.5 and 1; indifferent effect when it ranges between 1 and 4 and antagonist effect when FICi $\geq$4 [17,18].

2.5. Growth kinetics

Antimicrobial effects of synergistic combinations were studied by exposing bacterial cultures to different concentrations of TER, antibiotics and a combination of both in 96-well microplates following the method given by Ref. [19]. Absorbance was measured every hour for 24 h plotting results to obtain growth curves. Experiments were carried out in triplicate. Error bars were calculated using the Excel-Solver program, (Microsoft 365).

Kinetic curves were fitted to a logistic model using the same program.

$$\boldsymbol{Absorbance} = \frac{\boldsymbol{Cmax}}{\mathbf{1} + \boldsymbol{e}^{b-rt}} \quad \text{Equation 2}$$

Where C_{max} is the maximum population density achievable, r is the rate of population increase and b is the fitting parameter. C_{max}, r

and Tm_{50} (time in which half of the carrying capacity is reached) were calculated to determine the kinetics growth of synergistic combinations.

The significance of Kinetic curves differences compared to the control was assessed using an ANOVA for parametric data, conducted with SPSS software (version 28.0.1.0, 142).

2.6. Time-kill curves

Bactericidal properties of synergistic combinations were studied by exposing bacterial cultures to TER, ABXs and a combination of both at concentrations that showed synergy for 24h according to the method described in Ref. [20]. Samples were collected at 0, 2, 4, 6, and 24 h, serially diluted (from 10^{-1} to 10^{-7}), and 10 μL aliquots were inoculated onto appropriate agar plates. After the incubation time, colonies were counted, and results were plotted as log CFU (Colony-forming unit) vs. time (h). Experiments were carried out in triplicate. Combinations were considered synergies when the final CFU of the combination was 100 times lower than the remaining CFU of the most active product. Moreover, isolated compound or combination of TER and ABXs were considered bactericidal when the number of CFU was 1000 times lower than the control [21].

2.7. Multi-step resistance study (serial passage)

The development of resistance to these synergies was studied through the continuous passage of bacteria cultured in sub-MIC concentrations, following the methodology adapted from previous studies [22,23]. To achieve this, stock solutions of ABXs and TER were prepared separately. In 96-well plates, 100 μL of culture broth and 100 μL of serially diluted stock solutions were added to each well. For the study of synergies, only ABXs were serially diluted, while TER remained at the synergy concentration throughout the plate. Finally, 100 μL of bacterial inoculum, obtained from a 1:100 dilution of a McFarland 0.5 standard, was added to each well. After 24 h of incubation, the MIC was determined using a plate reader, following the same procedure described in section 2.3. This process was repeated daily for 30 days, using as inoculum the bacteria from the first well that exhibited growth (1/2 MIC), determining the MIC each day, which may increase or remain the same. On day 30, bacteria from the 1/2 MIC wells were plated on agar plates, and a final MIC determination was performed to assess whether the resistance generated would revert upon removal of the antibiotic pressure. Resistance was defined as a 4-fold increase in the initial MIC [24,25].

3. Results and discussion

3.1. Minimum inhibitory concentration of terpineol and antibiotics

Antimicrobial activity of TER and the ABXs tested can be seen in Table 2. It could be tested against every bacteria except *P. mirabilis* due to its sensitivity to the solvents concentrations needed.

The lowest MIC were 0.25 mg/mL for *A. baumanii* and *C. albicans* both using 5 % DMSO as solvent. It is important to note that *A. baumannii* is classified by the WHO as a critical priority pathogen [26], making its antimicrobial susceptibility especially relevant. TER also showed good antimicrobial effectiveness (MIC = 0.5 mg/ml) against other Gram-negative bacteria as *K. pneumoniae*, S. Typhimurium, *S. marcescens* and *P. aerogenes but also against* Gram-positive bacteria as *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. agalactiae* and. On the other hand, *E. coli, E. faecalis, L. monocytogenes, K. aerogenes* and especially *P aeruginosa* are less sensitive to TER.

In the lower section of Table 2, we have included data obtained from existing literature, specifically from a restricted set of experiments that exclusively examine pure TER (*tested against C. albicans, S. aureus, S.* Typhimurium, *and E. coli*). This is because the prevailing body of literature primarily concentrates on TER's antimicrobial effects within EOs, and only a specific subset of bacteria has been tested [27–29].

To our knowledge, there is no information on the antimicrobial activity of TER on *S. agalactiae* or *P. aerogenes*. There are hardly any MIC values for the rest of bacteria. For example [30], shows MIC values equal to ours for *E. faecalis* and [31] reported slightly higher values for *L. monocytogenes*.

Finally the ratio MBC/MIC $\leq$4 showed that TER was bactericidal in all cases tested.

The TER is a lipophilic compound (Log Kow = 2.67 [7], considered practically insoluble in water (Sigma-Aldrich product sheet) and a relatively small molecular size (154.25 g/mol). Similar to other monoterpenes, TER is suggested to function through partitioning bacterial cell membranes, disrupting their permeability, which results in cell lysis and the leakage of cellular proteins and lipids [31, 32]. TER interacts with phospholipid membranes, incorporating itself into these structures, and acting as impurities within the organized lipid bilayer, subsequently causing perturbation in the lipid fraction of the plasma membranes [33]. The mode of action appears to be quite similar between Gram-positive and Gram-negative bacteria. This is due to the phenolic structure, which not only interferes with the lipid bilayer of bacterial cells but also affects the lipid bilayer of the outer membrane in Gram-negative cell walls. Additionally, there is evidence of protein leakage from cell membranes in both types of bacteria [32]. The disturbance in bacterial membrane permeability possibly facilitates the entry of TER into the cell, potentially causing further disruption to organelle membranes such as mitochondria [34]. These alterations have been observed in the case of *E. coli* exposed to α-terpineol, leading to decreased cell size, irregular cell shape, loss of cytoplasm, bordered nuclear area, and ultimately, plasmolysis and vacuolization of the cell [35].

Differences observed among bacteria may be due to the net surface charge of microbial membranes and their lipid composition, as has been suggested for other monoterpenes [33,36]. This would explain why the antimicrobial effects of TER that we have detected

Table 2
MIC of terpineol and antibiotics.

			B. subtilis	*E. faecalis*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*S. agalactiae*	*A. baumannii*	*E. coli*	*K. aerogenes*	*K. pneumoniae*	*P. aerogenes*	*P. aeruginosa*	*S.* Typhimurium	*S. marcescens*	*C. albicans*
Natural product	Solvent															
Terpineol	DMSO	MIC (mg/mL)	**0.5**	>1	>1	>1	**0.5**	**0.25**	>1	**1**	**0.5**	**0.5**	>1	1	**0.5**	**0.25**
		MBC (mg/mL)	0.5	>1	>1	>1	1	0.25	>1	1	>1	0.5	>1	1	0.5	0.25
		MBC/MIC	1	–	–	–	>1	1	–	1	>1	1	–	1	1	1
	Tween-20	MIC (mg/mL)	0.5	**2**	**2**	**0.5**	0.5	*	2	*	0.5	*	>2	*	*	0.25
		MBC (mg/mL)	1	2	2	0.5	1	*	2	*	1	*	>2	*	*	1
		MBC/MIC	>1	1	1	1	>1	–	1	–	>1	–	–	–	–	>1
	Tween-80	MIC (mg/mL)	>2	>2	2	*	2	>2	**1**	1	1	1	*	**0.5**	*	1
		MBC (mg/mL)	>2	>2	>2	*	>2	>2	1	1	1	1	*	0.5	*	1
		MBC/MIC	–	–	>1	–	>1	–	1	1	1	1	–	1	–	1
Antibiotics	Solvent															
Amoxicillin	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.5**	<0.01	<0.01	<0.01	**0.125**	<0.01	>5	**0.25**	>500	/	**0.0625**	**0.125**	/
Ampicillin	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.5**	>5	<0.01	<0.01	**0.125**	<0.01	>5	**0.125**	>500	/	**0.0156**	**0.125**	/
Chloramphenicol	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.25**	<0.01	<0.01	<0.01	**0.0625**	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	**0.125**	/
Chlortetracycline	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01	/
Erythromycin	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.125**	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	**0.5**	**0.0625**	**0.0625**	>500	/	**0.0312**	**0.0156**	/
Florfenicol	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.0625**	**0.0156**	**0.0312**	<0.01	<0.01	**0.0625**	**0.0312**	<0.01	<0.01	/	<0.01	**0.0312**	/
Gentamycin	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.5**	**0.5**	**0.0156**	**0.0156**	**0.0156**	**0.0625**	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01	/
Neomycin	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	**0.0625**	**0.0156**	<0.01	<0.01	**0.0312**	**0.0312**	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01	/
Oxytetracycline	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01	/
Penicillin G	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	>5	>5	<0.01	<0.01	**0.5**	>5	>5	>5	>5	/	>5	>5	/
Streptomycin	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	**0.125**	**0.25**	**0.0625**	**0.125**	**0.0156**	**0.0312**	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	<0.01	/
Sulfadiazine	Water	MIC (mg/mL)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	/	*	*	/
Tetracycline	Water	MIC (mg/mL)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	/	<0.01	**0.0625**	/

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

	B. subtilis	*E. faecalis*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*S. agalactiae*	*A. baumannii*	*E. coli*	*K. aerogenes*	*K. pneumoniae*	*P. aerogenes*	*P. aeruginosa*	*S.* Typhimurium	*S. marcescens*	*C. albicans*
MIC Terpineol (Bibliography data)														
(1) *S. aureus:*							(3) *E. coli*							(4) *C. albicans*
0.22 mg/ml (Badawy et al., 2019) % DMSO				0.467 mg/ml (Wang et al., 2019) TWEEN 80 10 %			0.06 mg/ml (Guimaraes et al., 2019). 0.25 % DMSO							0.06 % (%V/V) (Coradi Tonon et al., 2019) 0.4 % DMSO
unknow				0.12 mg/ml (Guimaraes et al., 2019) 0.25 % DMSO			0.75 (Wang et al., 2019) TWEEN 80 10 %							
0.75 mg/mL (Wang et al., 2019) TWEEN 80				0.76–1.56 mg/ml (Huang et al., 2021) DMSO 5 %			0.76–1.56 mg/ml (Huang et al., 2021) DMSO 5 %							0.06 %–0.5 % (%V/V) (Marcos-Arias et al., 2011)
10 %				1.5 mg/ml (Yang et al., 2014) TW 20 + TW 80			3 mg/ml (Yang et al., 2014) TW 20 + TW 80							TWEEN 80 0.1 %
0.3–0.7 mg/ml (Albano et al., 2016) DMSO 50 %														
1.5 mg/ml (Yang et al., 2014) TWEEN 20 + 80														

The blond font indicates combinations chosen for the checkboard method. Asterisks (*) indicate that the MIC was not tested due to solvent toxicity, and a slash (/) indicates that the assay was not carried out due to the absence of antimicrobial activity of TER in the MIC tests.

show differences depending on the bacterial envelope.

3.2. Synergies of terpineol with the 8 antibiotics

Table 3 shows FICis of combinations of TER with selected ABXs. Following equation (1) and (6) combinations showed synergism (FICi≤0.5), 24 additivity (0.5<FICi≤1) and 13 indifferent behaviors (1<FICi<4). None of the combinations showed antagonism (FICi≥4).

In the final two columns, the percentage reduction of MIC for both the ABXs and TER in the synergistic combinations can be observed. The six combinations displaying synergy, hence producing maximum effect with minimal quantities of the two compounds, were selected for a more detailed investigation. This involved isobolograms and the study of their kinetics complemented with kill curves.

Fig. 1(a–f) displays isobolograms representing the 6 synergistic combinations. Each combination exhibited a single synergistic point (positioned below the lower dotted line), while the remaining concentrations tested appeared as points situated between the two dotted lines.

3.3. Effect of terpineol on microbial kinetics and kill curves

Fig. 2a through 7a depict the kinetics of synergies. They illustrate various concentrations of TER alone (green lines), ABX

Table 3
MIC and FICi of terpineol and antibiotics combinations.

Microorganism	Antibiotic	MIC antibiotic alone	MIC terpineol alone	MIC antibiotic in combination	MIC terpineol in combination	FICi index	ABX decrease (%)	Terpineol Decrease (%)
E. faecalis	AMP	0.5	2	0.5	2	2	0.0	0.0
	AMO	0.5	2	0.5	2	2	0.0	0.0
	GTM	0.5	2	0.125	1	0.75	75.0	50.0
	STM	0.125	2	0.0625	0.5	0.75	50.0	75.0
	ERY	0.125	2	0.125	2	2	0.0	0.0
	CHL	0.25	2	0.125	1	1	50.0	50.0
	FF	0.0625	2	0.0312	1	1	50.0	50.0
L. monocytogenes	GTM	0.5	2	0.25	1	1	50.0	50.0
	STM	0.25	2	0.125	1	1	50.0	50.0
	FF	0.0156	2	0.0078	1	1	50.0	50.0
	NMC	0.0625	2	0.0312	1	1	50.0	50.0
S. aureus	GTM	0.0156	0.5	0.0039	0.125	**0.5**	75.0	75.0
	STM	0.0625	0.5	0.0312	0.25	1	50.0	50.0
	FF	0.0312	0.5	0.0078	0.0625	**0.375**	75.0	87.5
	NMC	0.0156	0.5	0.0078	0.25	1	50.0	50.0
S. agalactiae	GTM	0.0156	0.5	0.0039	0.125	**0.5**	75.0	75.0
	STM	0.125	0.5	0.0156	0.25	0.625	87.5	50.0
A. baumannii	PEN	0.5	0.25	0.5	0.25	2	0.0	0.0
	AMP	0.125	0.25	0.125	0.25	2	0.0	0.0
	AMO	0.125	0.25	0.125	0.25	2	0.0	0.0
	GTM	0.0156	0.25	0.0039	0.0625	**0.5**	75.0	75.0
	STM	0.0156	0.25	0.0019	0.125	0.625	87.8	50.0
	CHL	0.0625	0.25	0.0625	0.25	2	0.0	0.0
E. coli	GTM	0.0625	1	0.0156	0.5	0.75	75.0	50.0
	STM	0.0312	1	0.0156	0.5	1	50.0	50.0
	ERY	0.5	1	0.25	0.5	1	50.0	50.0
	FF	0.0625	1	0.0312	0.5	1	50.0	50.0
	NMC	0.0312	1	0.0156	0.5	1	50.0	50.0
K. aerogenes	ERY	0.0625	1	0.0312	0.5	1	50.0	50.0
	FF	0.0312	1	0.0312	1	2	0.0	0.0
	NMC	0.0312	1	0.0312	1	2	0.0	0.0
K. pneumoniae	AMP	0.125	0.5	0.125	0.5	2	0.0	0.0
	AMO	0.25	0.5	0.25	0.5	2	0.0	0.0
	ERY	0.0625	0.5	0.0312	0.25	1	50.0	50.0
S. Typhimurium	AMP	0.0156	0.5	0.0078	0.25	1	50.0	50.0
	AMO	0.0625	0.5	0.0312	0.25	1	50.0	50.0
	ERY	0.0312	0.5	0.0019	0.25	0.562	93.9	50.0
S. marcescens	AMP	0.125	0.5	0.125	0.5	2	0.0	0.0
	AMO	0.125	0.5	0.125	0.5	2	0.0	0.0
	ERY	0.0156	0.5	0.0078	0.25	1	50.0	50.0
	TC	0.0625	0.5	0.0156	0.125	**0.5**	75.0	75.0
	CHL	0.125	0.5	0.0156	0.125	**0.375**	87.5	75.0
	FF	0.0312	0.5	0.0156	0.25	1	50.0	50.0

The blond font indicates synergy combinations.

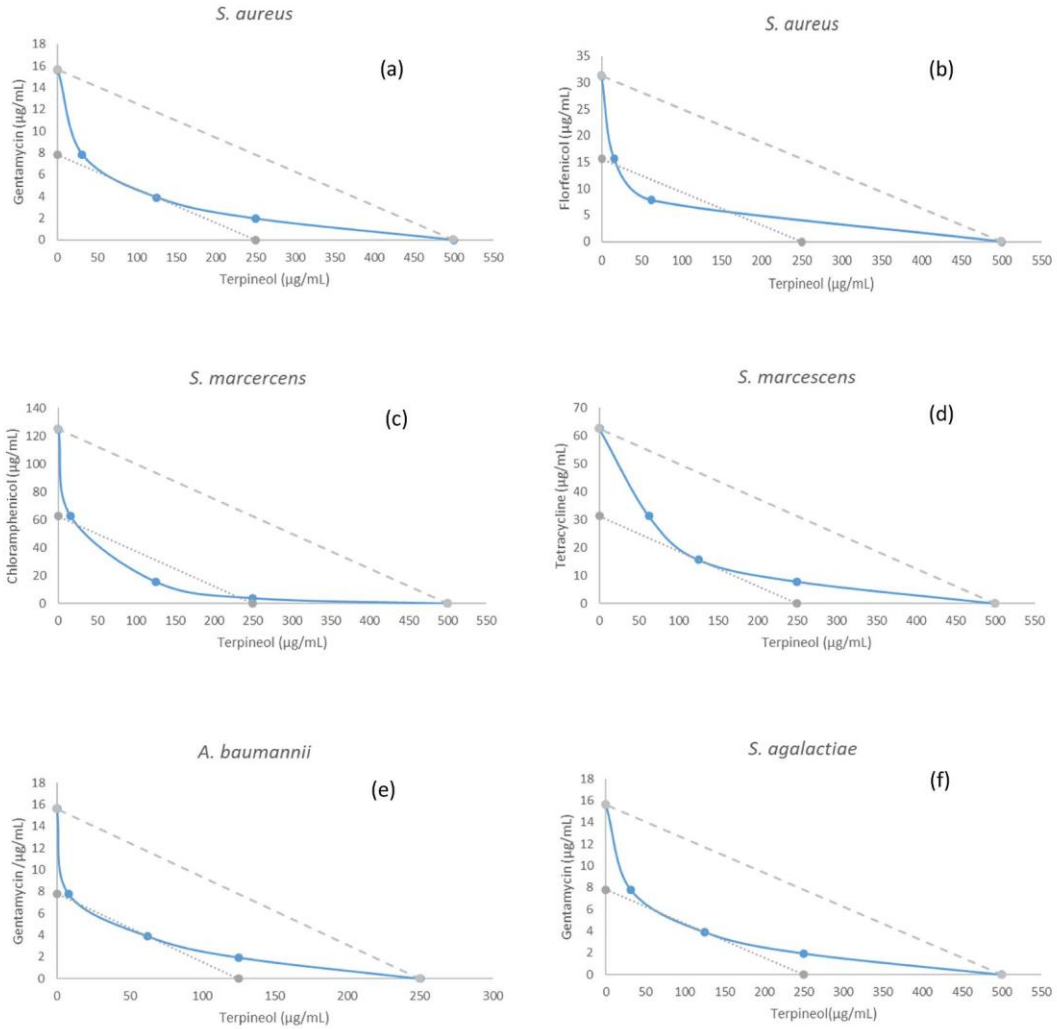


Fig. 1. Isobolograms of synergistic interactions of TER. Dots represents MIC of checkboard concentrations tested of TER (X-axis) and antibiotics (Y-axis). Upper dashed line represents the addition limit and lower dotted line represents the synergy limit. Only dots below lower dotted line fulfill the requirements to be considered synergies.

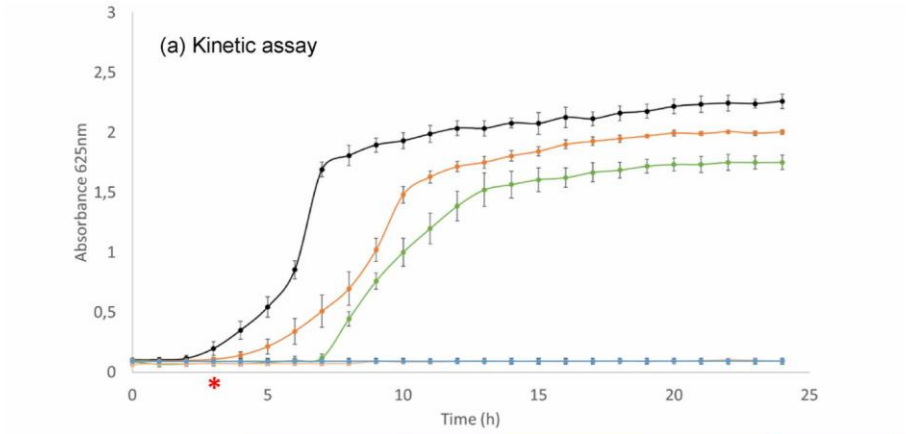
concentrations alone (red lines), and combined synergistic concentrations (blue line). The intensity of the curve's color corresponds to the concentration of the compound alone, with the black line representing the growth control. The Cmax, r, and Tm_{50} values calculated following equation (2), are presented in an accompanying table linked to the graphs. All differences with the control are significant at 3 or 4 h.

On the other hand, Fig. 2c through 7c illustrate the kill curves of the synergies. These figures utilize the same color scheme but exclusively plot TER, ABX, synergy, and the control concentrations.

The study of the kinetics of the concentrations at which TER and ABX are found in synergy in each case allows us to visualize the effect that each one produces separately on the bacteria, and it is here that we observe interesting differences. On the other hand, as expected, both the MIC concentration of ABX and TER, as well as the synergy between them, result in a 100 % reduction in bacterial growth and increased mortality in all cases.

To the best of our knowledge, this is the first time that synergistic effects of (TER) with any (ABX) have been described in the selected bacteria. However, there is some preliminary evidence of synergistic effects of plant extracts containing small percentages of TER with aminoglycosides [37,38]. As for the pure product, there are *in silico* studies indicating additive effects of TER with metronidazole against *H.pylori* [39] and alpha-terpineo with gentamicin on *P. aeruginosa* [40].

Possible mechanisms involving natural products and antibiotics may explain the increased efficacy of GTM, FF, CHL, and TC when combined with TER. For instance, monoterpenes can alter the structure and function of cell membranes, facilitating the intracellular action of antibiotics [34]. Natural products can also modify bacterial resistance mechanisms by inhibiting extracellular enzymes that modify or degrade antibiotics, reducing the production of capsular polysaccharides, or deactivating efflux pumps to enhance the intracellular accumulation of antibiotic molecules [41–43]. Additionally, natural products can disrupt quorum sensing signal



(b) fitting parameters	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL)	MIC gentamycin (15.6µg/mL)	Synergy gentamycin (3.9µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL) + tetracycline (3.9µg/mL)
Cmax (Absorbance)	2.1	0.6	1.7	0.6	2.0	0.5
r	0.5	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	9.6	>1000	8.7	>1000

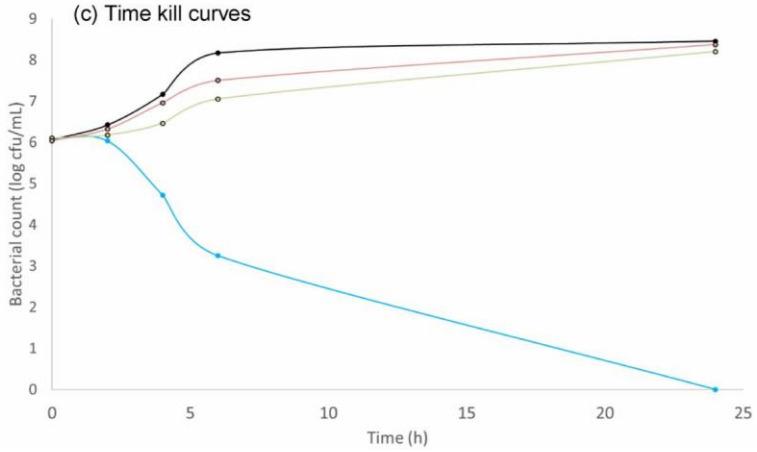


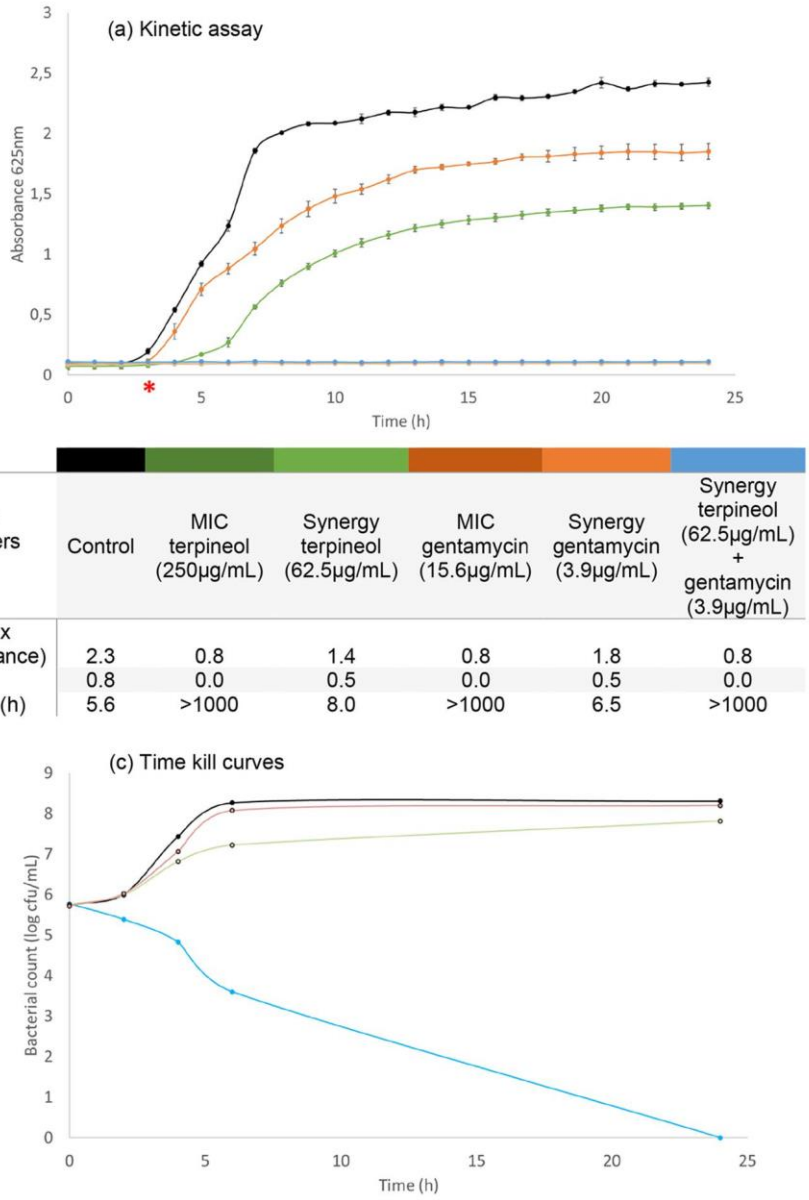
Fig. 2. Kinetic assay (a), model parameters (b) and time kill curves (c) of TER (green lines) and GTM (red lines) against *S. agalactiae*. Black curves correspond to the control. Error bars are standard deviations (n = 3). Red asterisk indicates the time when significant differences in bacterial growth compared to control begin (ANOVA $p \leq 0.05$).

molecules and their corresponding receptors [44].

According to the previously discussed mechanism of TER action, it seems plausible that in synergy, this compound destabilizes the bilipid cell membranes, including both the bacterial cell membrane of Gram-positive (*S. aureus* and *S. agalactiae*) and Gram-negative bacteria (*S. marcescens* and *A. baumanii*), as well as the outer membrane of the latter. This would lead to a modification of the active sites of the ABXs in the bacterial cell wall and plasma membrane, facilitating the passage of ABXs to their intracellular ribosomal target, thereby increasing ABX efficacy and reducing their MIC. This non-specific permeabilizing activity of phytochemicals has been suggested by other authors and could potentially sensitize bacteria, modulating their susceptibility to ABXs at lower concentrations [36, 45,46].

However, this mechanism of action may exhibit variations or other additional effects, as we observe distinct behaviors of TER or each ABX when applied individually to different bacteria.

The first noteworthy effect is that TER at the synergy concentration demonstrates a more intense antimicrobial activity against *S. agalactiae* and *A. baumanii* compared to GTM as indicated by the higher Cmax values of the ABX (Fig. 2(a and b) and 3(a-b). GTM is a



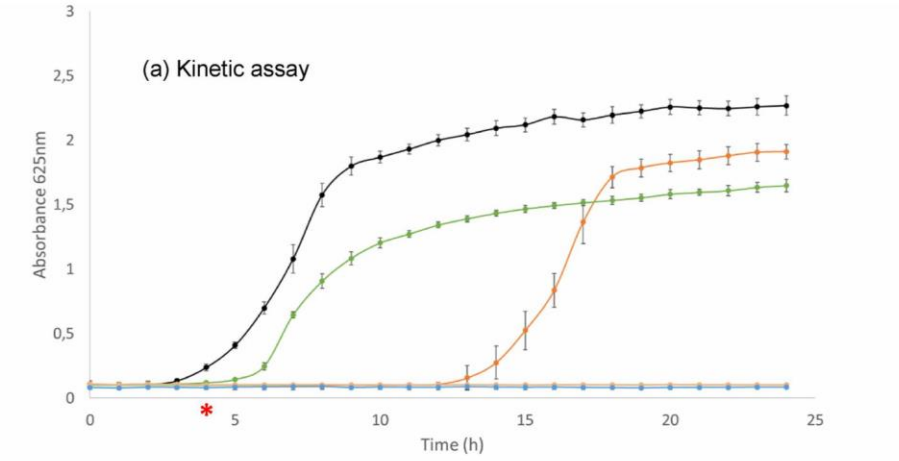
(b) fitting parameters	Control	MIC terpineol (250µg/mL)	Synergy terpineol (62.5µg/mL)	MIC gentamycin (15.6µg/mL)	Synergy gentamycin (3.9µg/mL)	Synergy terpineol (62.5µg/mL) + gentamycin (3.9µg/mL)
Cmax (Absorbance)	2.3	0.8	1.4	0.8	1.8	0.8
r	0.8	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
Tm50 (h)	5.6	>1000	8.0	>1000	6.5	>1000

Fig. 3. Kinetic assay (a), model parameters (b) and time kill curves (c) of TER (green lines) and GTM (red lines) against *A. baumannii*. Black curves correspond to the control. Error bars are standard deviations (n = 3). Red asterisk indicates the time when significant differences in bacterial growth compared to control begin (ANOVA $p \leq 0.05$).

broad-spectrum ABX that binds to the 30S subunit of the bacterial ribosome, inhibiting protein synthesis, making it effective against both Gram-positive streptococci and *A. baumannii*. However, neither of the two compounds individually can induce bacterial death (Figs. 2c and 3c), a result achieved only in synergy, with a reduction of the bacterial population by 8 log CFU/mL compared to their respective controls.

In addition to previously discussed effect of TER in destabilizing cell membranes, a different mechanism of action has been proposed for the synergy between alpha-terpineol and GTM in another Gram-negative bacterium, *P. aeruginosa*. It appears that TER could attenuate quorum sensing-regulated virulence by reducing the activity of quorum sensing genes, thereby impacting AHL (N-acyl homoserine lactone) production and bacterial virulence regulation [40]. The combination of both mechanisms could explain the antimicrobial efficacy of these GTM/TER synergies in *S. agalactiae* and *A. baumanii*.

The second relevant effect can be observed in Fig. 4(a and b) and 5(a-b), which depict the kinetic curve of *S. aureus* exposed to the antibiotics GTM and FF in combination with TER. In both cases, though more pronounced in the case of GTM, it can be observed that the growth of *S. aureus* recovers when exposed solely to GTM (after approximately 12 h) or FF (after around 11 h), but not in the



(b) fitting parameters

	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL)	MIC gentamycin (15.6µg/mL)	Synergy gentamycin (3.9µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL) + gentamycin (3.9µg/mL)
Cmax (Absorbance)	2.2	0.7	1.6	0.7	1.9	0.7
r	0.7	0.0	0.6	0.0	0.9	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	7.9	>1000	16.1	>1000

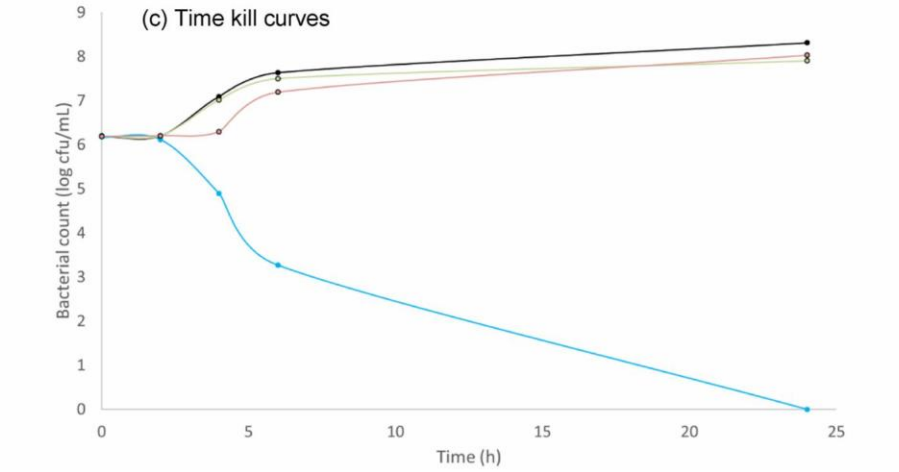
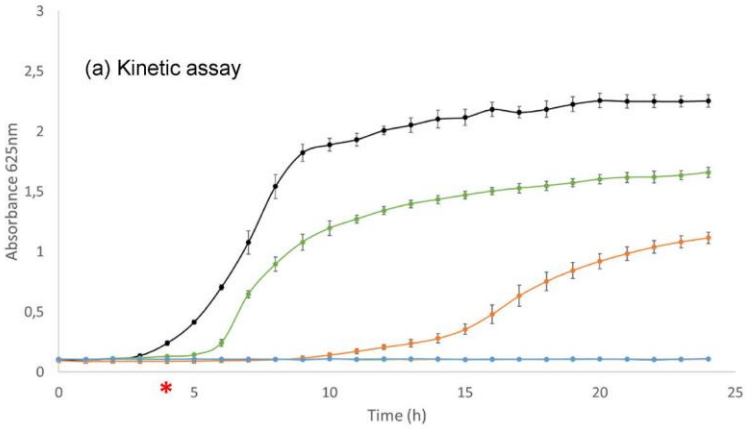


Fig. 4. Kinetic assay (a), model parameters (b) and time kill curves (c) of TER (green lines) and GTM (red lines) against *S. aureus*. Black curves correspond to the control. Error bars are standard deviations (n = 3). Red asterisk indicates the time when significant differences in bacterial growth compared to control begin (ANOVA $p \leq 0.05$).

synergy, presumably due to the effect of TER. Therefore, even though Cmax and r do not capture these variations, the slow recovery of the antibiotic is reflected in a Tm_{50} for GTM more than double that of TER. Similar to GTM, FF inhibits protein synthesis but by binding to the large ribosomal subunit, the 50S, interfering with peptidyltransferase activity.

The effect of TER, as in other cases, remains more constant, likely due to its damage to the bacterial envelope. Indeed, as reflected in the Kill curves of these synergies (Figs. 4c and 5c), the mortality of the bacterial population is 100 % at 24 h in the case of GTM and lower in the case of FF (49 %).

The recovery of *S. aureus* may be attributed to the population-level selection of individuals more resistant over time, given that this bacterium exhibits multiple resistance mechanisms. Specifically, when confronted with FF or GTM, it possesses efflux pumps, antibiotic-modifying enzymes such as aminoglycoside-modifying enzymes [47], chloramphenicol acetyltransferase [48], or the ability to modify the ribosomal target [48], as will be discussed in the following section.



(b) fitting parameters	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Synergy terpineol (62.5µg/mL)	MIC florfenicol (31.2µg/mL)	Synergy florfenicol (7.8µg/mL)	Synergy terpineol (62.5µg/mL) + florfenicol (7.8µg/mL)
Cmax (Absorbance)	2.2	0.9	1.6	0.9	1.3	0.9
r	0.7	0.0	0.5	0.0	0.3	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	8.0	>1000	17.7	>1000

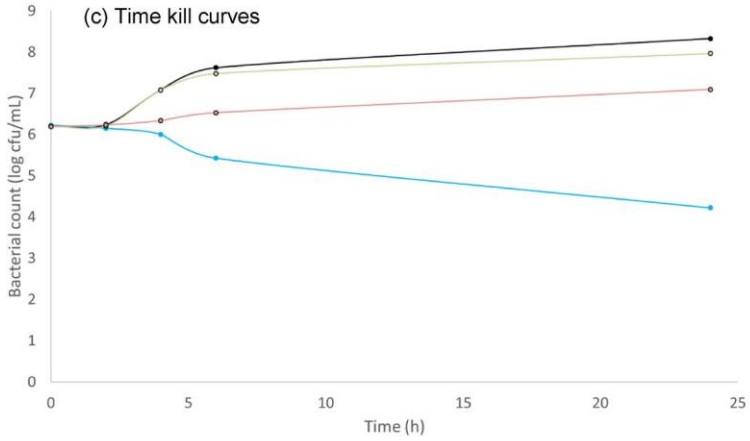
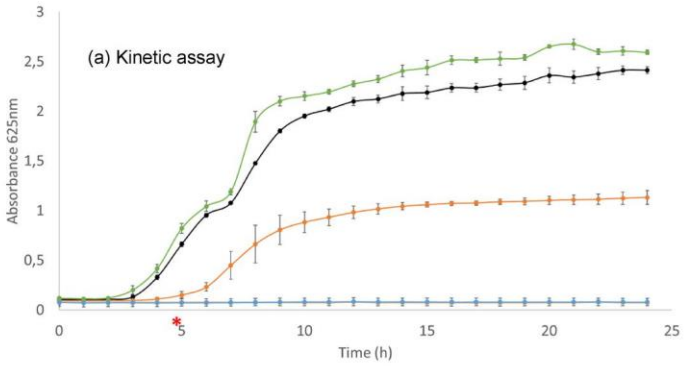


Fig. 5. Kinetic assay (a), model parameters (b) and time kill curves (c) of TER (green lines) and FF (red lines) against *S. aureus*. Black curves correspond to the control. Error bars are standard deviations (n = 3). Red asterisk indicates the time when significant differences in bacterial growth compared to control begin (ANOVA $p \leq 0.05$).

A possible explanation for why the effect of TER in synergy with GTM or FF prevents *S. aureus* recovery may be due to multi-target effects [49]. In addition to what has been mentioned earlier, the disruption of the membrane caused by TER may impede the bacteria from developing resistance mechanisms, especially those associated with the bacterial envelope, such as efflux pumps [49]. For example, propolis was found to be able to block the *S. aureus* pump system, although the mechanism is unknown [50].

Finally, In the case of *S. marcescens,* as shown in Fig. 6(a–c) and 7(a-c), a different behavior of TER is observed, resulting in a significant increase in bacterial growth instead of inhibition increasing Cmax and reducing the time needed to achieve 50 % of that Cmax. This suggests that, far from affecting *S. marcescens*, it may potentially utilize TER as a substrate for its metabolism. In fact, it has been reported that a strain of the bacterium *S. marcescens*, isolated from sewage sludge, can oxidize the monoterpene alpha-pinene derived from essential oils of plants pinene [51]. In nature, many bacteria are capable of metabolizing defensive chemicals produced by plants, such as monoterpenes. Thus, bacterial communities associated with oviposition pits of the beetle *Monochamus saltuarius* [52], isolated from pine engravers [53] or associated with the Chinese pine bark beetle, *Dendroctonus valens* [54], all rich in *Serratia*, have demonstrated a great capacity to degrade monoterpenes.

However, surprisingly, in the synergy, when both CHL and TC are added, total growth inhibition occurs, and there is a reduction of the *S. marcescens* population by 5 log CFU/mL compared to the control in the case of CHL and 5 log CFU/mL in the case of TC, as seen



(b) fitting parameters	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL)	MIC chloramphenicol (125µg/mL)	Synergy chloramphenicol (15.6µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL) + chloramphenicol (15.6µg/mL)
Cmax (Absorbance)	2.3	0.6	2.5	0.6	1.1	0.6
r	0.5	0.0	0.5	0.0	0.6	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	6.7	>1000	7.6	>1000

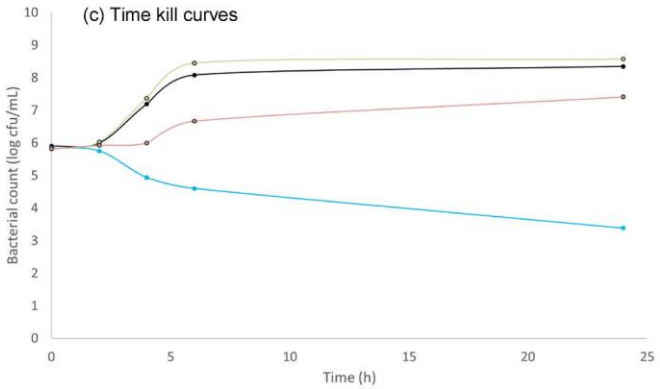
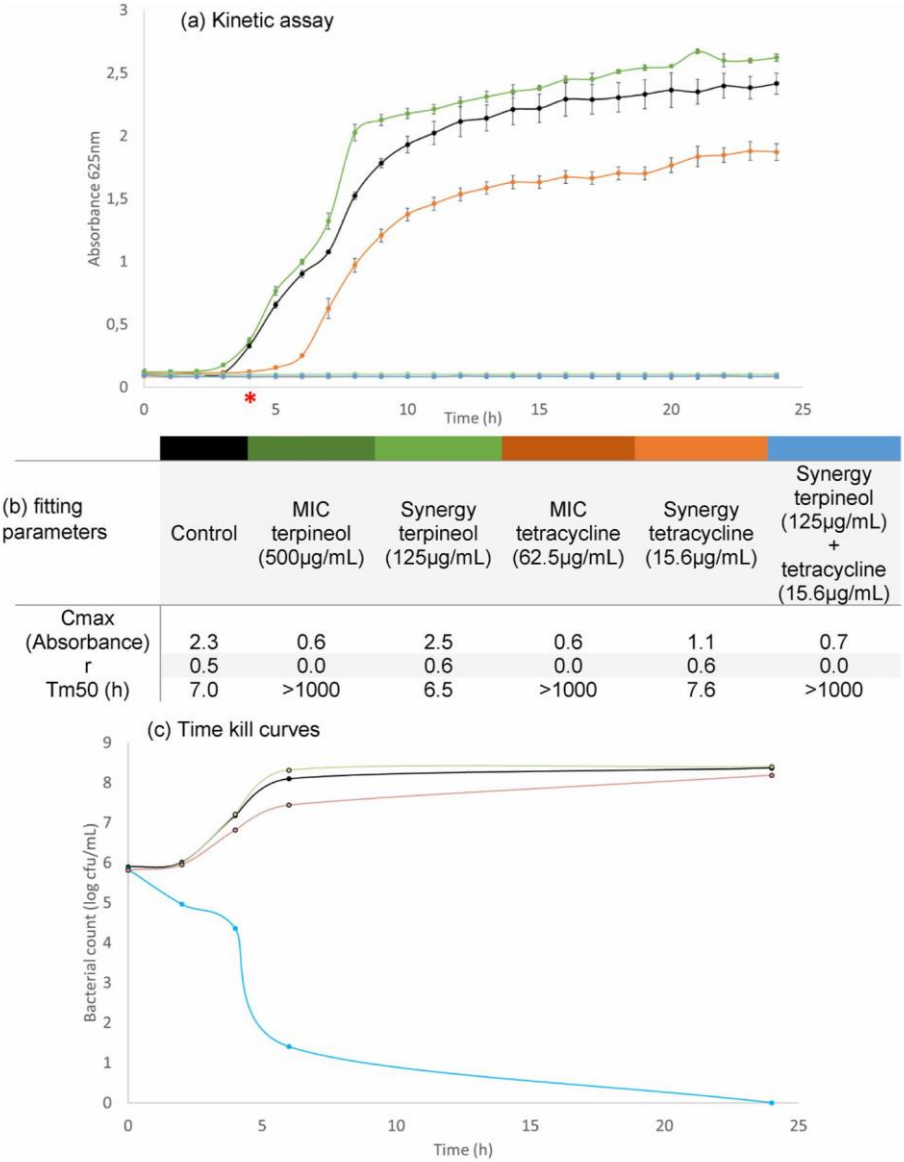


Fig. 6. Kinetic assay (a), model parameters (b) and time kill curves (c) of TER (green lines) and CHL (red lines) against *S. marcenses*. Black curves correspond to the control. Error bars are standard deviations (n = 3). Red asterisk indicates the time when significant differences in bacterial growth compared to control begin (ANOVA $p \leq 0.05$).

by the decrease in Cmax and r and the increase in Tm_{50} compared to ABX alone or TER alone. CHL binds to the 50S subunit of the bacterial ribosome, specifically to the active center of peptidyl transferase, and TC binds to the 30S subunit of the bacterial ribosome, specifically to the A site of the 16S ribosomal RNA. In both cases, elongation of the polypeptide chain is blocked, leading to the interruption of protein synthesis.

Although the bacterium may be capable of metabolizing TER, it is likely that the permeabilization performed by this compound on the bacterial envelope of *Serratia* still allows greater passage of both antibiotics. However, it is also possible that this damage to the envelope affects resistance mechanisms of *Serratia* linked to the outer membrane of its cell wall. *Serratia* has a modified lipopolysaccharide (LPS) where cationic phosphate groups are substituted by L-Ara4N [55]. This modification increases the net negative charge of lipidA of LPS, resulting in antibiotics being repelled by bacterial cells [56]. This could theoretically also affect the interaction with CHL and TC, influencing the passage of these antibiotics through the outer membrane. The modification of the envelope by TER may affect this resistance mechanism.

TER has been approved by the EPA as a non-food inert ingredient that can be used in perfumes, cosmetics or cleaning products among other; and by the FDA as a synthetic flavoring substance that can be safely used in food at minimum concentration needed. Based on the toxicity data available, these agencies consider this product suitable for human exposure through all routes of administration, which could facilitate a possible clinical application [57]. Moreover, ABXs used in this study, with which TER have shown synergies, have passed rigorous clinical trials showing appropriated safety and effectiveness. Therefore, the combined use of TER and antibiotics could be considered in order to reduce the necessary antibiotic concentration, thereby decreasing the occurrence of side effects.



(b) fitting parameters	Control	MIC terpineol (500µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL)	MIC tetracycline (62.5µg/mL)	Synergy tetracycline (15.6µg/mL)	Synergy terpineol (125µg/mL) + tetracycline (15.6µg/mL)
Cmax (Absorbance)	2.3	0.6	2.5	0.6	1.1	0.7
r	0.5	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0
Tm50 (h)	7.0	>1000	6.5	>1000	7.6	>1000

Fig. 7. Kinetic assay (a), model parameters (b) and time kill curves (c) curves of TER (green lines) and TC (red lines) against *S. marcenses*. Black curves correspond to the control. Error bars are standard deviations (n = 3). Red asterisk indicates the time when significant differences in bacterial growth compared to control begin (ANOVA $p \leq 0.05$).

3.4. Effect of TER on antibiotic resistance

Fig. 8(a–f) shows the evolution of MICs of TER, ABXs, and the synergies studied. The most notable effect is that, in all cases, the TER + ABX synergy generates fewer resistances (measured as an increase in MIC) than the antibiotic at the MIC concentration. However, in some cases, it can reach the MIC of the ABX after prolonged exposure, starting from 28 days.

The tested antibiotics, on the other hand, generated bacterial resistances ranging from an 8- to 32-fold increase of the initial MICs. Gentamycin, for example, rapidly generated resistance in *S. aureus*, *A. baumannii*, and *S. agalactiae* on days 8, 6, and 9, respectively.

TER has the lowest capacity to generate resistance, producing at most a 4-fold increase in the MIC concentration in *S. aureus* and *S. marcescens*, which is the threshold considered to indicate resistance generation capability [24,25].

Since the bacterial populations of each strain are pure, an initial selection of the most resistant strains within the population cannot occur at first, although this mechanism may operate later. Horizontal gene transfer, for example through plasmids, is also not expected, as the bacteria are genotyped reference strains that do not possess plasmids with resistance genes. Therefore, in all cases, it is expected that the bacteria exposed to the antimicrobials either harbored innate resistance genes that were expressed, or acquired adaptive mutations, allowing the selection of more resistant individuals over the course of continued antimicrobial exposure. In fact, our

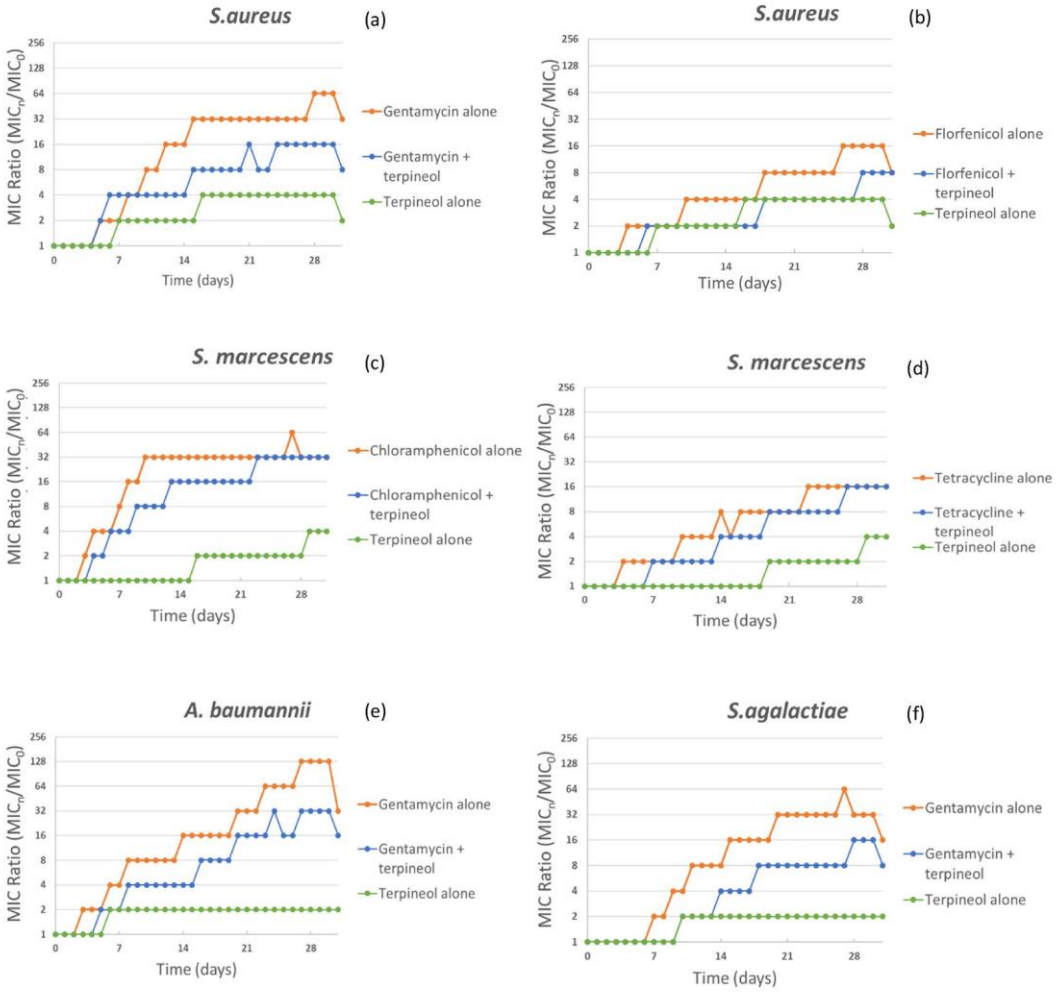


Fig. 8. Effect of antibiotics (orange line), terpineol (green line) and synergistic combinations (blue lines) on resistance selection (serial passage) in *S. aureus*, *S. marcescens*, *A. baumanii* and *S. agalactiae.* MIC_0 (Initial minimum inhibitory concentration), MIC_n (MIC on a given day (n)).

reference strain *S. marcescens* exhibits several of these intrinsic resistance genes, as discussed below. This process differs in the case of the antibiotic alone, TER alone, or the synergy of both, depending on the activated resistance mechanism.

We observe that TER is less capable of producing resistance probably because it does not have a target as specific as that of ABXs. As mentioned, its primary action is the alteration of bacterial membranes, making it more difficult for point mutations to generate resistant bacteria. There is no information in the literature about the generation of microbial resistance to TER, although one case has been documented for *S. aureus*. After treating this bacterium (strain SH 1000) with terpinen-4-ol, extracted from tea tree oil, the gene encoding efflux pumps was expressed [58]. This increase in gene expression could be a mechanism by which the bacteria develop resistance to terpenes, using efflux pumps to expel these substances, which could explain the slight increase in resistance to TER observed in Fig. 8a and b.

ABXs have mechanisms of action on specific targets, which makes it easier for point mutations in these areas to generate resistant bacteria. In our case, the four ABXs act on ribosomal targets. Mutations at these points can facilitate the emergence of resistant mutants. However, the presence of certain chromosomal genes of intrinsic resistance in our reference strains can also play a role.

Several resistance mechanisms of *A. baumannii* against aminoglycosides as GTM are known [59]: enzymatic inactivation of antibiotics by aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) that reduce ABX binding capacity, modification of ribosomal antibiotic targets by 16S rRNA methyltransferases, and altered antibiotic transport through membranes, either by reduced porin permeability or increased efflux pump activity. *A. baumannii* exhibits intrinsic resistance to many antibiotics and appears to have acquired resistance to ABXs in 19 %–31 % of cases [60]. The resistance within the genome is associated mainly with the genes aac(2′)-Ib, and aph(3″)-Ib; or aph(6)-Id [61]. However, these genes are not present in our reference strains, indicating that the observed resistance must be due to other targets.

S. marcescens resists tetracycline mainly through the expression of efflux pumps encoded by the genes tetR/tetA (present in our reference strain) and others such as tetC, tetG, tetH. While these genes are more commonly found on plasmids, they have also been

reported on the chromosome in some cases [62]. Against CHL, chromosomal genes involved in efflux pumps include SdeAB [63] and Catb [64], both present on the chromosome of our strain.

S. aureus has several key resistance mechanisms against aminoglycosides. It modifies aminoglycosides enzymatically through transferases, which prevents their effective antibacterial action [65]. The resistance of *S. aureus* to FF is primarily mediated through the expression of efflux pumps. The main genes reported in the literature are aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia and aph(3′)-IIIa for a aminoglycosides and fexA for FF [66]. However, none of these genes have been reported in our reference strains.

Finally, *S. agalactiae* has various resistance mechanisms against aminoglycosides, with one of the most well-known being the enzymatic inactivation of the antibiotic encoded by the gene aac(6′)-aph(2″) [67], although this gene is also not found in our reference strains.

Given that TER has a low potential to generate resistance, it seems plausible that in combination therapy, the resistance-generating effect stems from the ABX and is somewhat reduced because the concentration of ABX in synergy is lower than its MIC. Moreover, with two agents acting simultaneously on different cellular targets, it is more difficult for the bacteria to develop strategies against both.

However, one cannot rule out a synergistic effect between TER and ABX to decrease resistance to ABXs. Numerous natural products have been shown to inhibit bacterial resistance mechanisms, thus reducing the capacity of ABX to generate resistance. For example, the combination of *Aloe vera* and ceftiofur or cloxacillin delays the emergence of chromosomal resistance in *S. aureus* strains [68]. This has also been described for various terpenes and several bacteria, especially *S. aureus* [69,70], although not specifically for TER to our knowledge.

Therefore, the most likely explanation is that, given TER's ability to disrupt membranes, it affects multiple bacterial resistance mechanisms associated with these membranes, such as efflux pumps. Further research is needed to clarify this mechanism of action.

4. Conclusions

TER exhibits antimicrobial activity against most of the 14 clinically and veterinary relevant bacteria tested, including those in the ESKAPE group, for which the development of new antimicrobial strategies is most urgent according to the WHO. This activity is primarily bactericidal. Furthermore, this study demonstrates that TER can establish additive and synergistic relationships with multiple ABXs, leading to a reduction in their MIC and enhancement of antimicrobial activity. The kinetics study of the synergies reveals distinct behaviors of TER when acting alone, depending on the bacterium and the specific ABX involved in the synergy. This suggests different mechanisms of action for the TER + ABX synergy, warranting further investigation.

Finally, we have demonstrated for the first time that TER not only produces fewer resistances than commercial antibiotics against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, but also reduces the emergence of resistances when used in combination with them. Therefore, the properties of TER as a natural antibiotic enhancer and as an Antimicrobial Resistance Modifying Agent make it a promising product for use alongside commercial antibiotics to combat antimicrobial resistance. Additionally, regulatory agencies such as the EPA and FDA consider this product suitable for human exposure through all administration routes, thereby facilitating potential clinical applications.

CRediT authorship contribution statement

Antonio Valenzuela: Writing – original draft, Visualization, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Cristina Gan:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Natalia Ferrando:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Elisa Langa:** Writing – review & editing, Supervision, Conceptualization. **Diego Ballestero:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Conceptualization. **María Rosa Pino-Otín:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Data availability statement

Data will be available on request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was funded by Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento (Group T67_23R grant), Gobierno de Aragón, pre-doctoral fellowship CPB_08_21 grant; Cátedra NOVALTIA, Cátedra TEVA and Universidad San Jorge.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e43932.

References

[1] T.P. Van Boeckel, S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B.T. Grenfell, S.A. Levin, R. Laxminarayan, Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of Cross Mark 742 national pharmaceutical sales data, Lancet Infect. Dis. 14 (2014) 742–750, https://doi.org/10.1016/s1473-3099(14)70780-7.
[2] B.A. Cunha, Antibiotic resistance: a historical perspective, Semin. Respir. Crit. Care Med. 21 (2000) 3–8, https://doi.org/10.1055/s-2000-9925.
[3] Z. Lin, T. Yuan, L. Zhou, S. Cheng, X. Qu, P. Lu, Q. Feng, Impact factors of the accumulation, migration and spread of antibiotic resistance in the environment, Environ. Geochem. Health 43 (2021) 1741–1758, https://doi.org/10.1007/s10653-020-00759-0.
[4] L. Sanhueza, R. Melo, R. Montero, K. Maisey, L. Mendoza, M. Wilkens, Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against Staphylococcus aureus and Escherichia coli, PLoS One 12 (2017), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273.
[5] J.E.C. Betoni, R. Passarelli Mantovani, L. Nunes Barbosa, L.C. Di Stasi, A. Fernandes Junior, Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on Staphylococcus aureus diseases, Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz 101 (2006) 387–390, https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000400007.
[6] M. Ayaz, F. Ullah, A. Sadiq, F. Ullah, M. Ovais, J. Ahmed, H.P. Devkota, Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: potential strategy to counteract drug resistance, Chem. Biol. Interact. 308 (2019) 294–303, https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.050.
[7] A. Sales, L.d.O. Felipe, J.L. Bicas, Production, properties, and applications of alpha-terpineol, Food Bioprocess Technol. 13 (2020) 1261–1279, https://doi.org/10.1007/s11947-020-02461-6.
[8] C. Khaleel, N. Tabanca, G. Buchbauer, alpha-Terpineol, a natural monoterpene: a review of its biological properties, Open Chem. 16 (2018) 349–361, https://doi.org/10.1515/chem-2018-0040.
[9] J. Huang, L. Yang, Y. Zou, S. Luo, X. Wang, Y. Liang, Y. Du, R. Feng, Q. Wei, Antibacterial activity and mechanism of three isomeric terpineols ofCinnamomum longepaniculatumleaf oil, Folia Microbiol. 66 (2021) 59–67, https://doi.org/10.1007/s12223-020-00818-0.
[10] X. Huang, S.-y. Chen, Y. Zhang, Y.-h. Wang, X. Zhang, Z.-y. Bi, H.-b. Yuan, Chemical composition and antifungal activity of essential oils from three artemisia species against Alternaria solani, Journal of Essential Oil Bearing Plants 22 (2019) 1581–1592, https://doi.org/10.1080/0972060x.2019.1708812.
[11] M.N. Tosun, G. Taylan, N.N.D. Zorba, Antibacterial and antibiofilm activities of some plant essential oils and synergistic effects of cinnamon essential oil with vancomycin against Clostridioides difficile: in vitro study, Lett. Appl. Microbiol. 75 (2022) 598–606, https://doi.org/10.1111/lam.13747.
[12] K.M. Khleifat, S.A. Matar, M. Jaafreh, H. Qaralleh, M.O. Al-limoun, K.Y. Alsharafa, Essential oil of centaurea damascena aerial parts, antibacterial and synergistic effect, Journal of Essential Oil Bearing Plants 22 (2019) 356–367, https://doi.org/10.1080/0972060x.2019.1626292.
[13] G.A. Pankey, O.C.F. Section of Infectious Diseases, New orleans, Louisiana, L.D. Sabath, D.o.I.D. University of Minnesota, department of medicine, Minneapolis, Minnesota, clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections, Clin. Infect. Dis. 38 (2023) 864–870, https://doi.org/10.1086/381972.
[14] E.M. Williamson, Synergy and other interactions in phytomedicines, Phytomedicine 8 (2001) 401–409, https://doi.org/10.1078/0944-7113-00060.
[15] R.-s. Pei, F. Zhou, B.-p. Ji, J. Xu, Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E-coli with an improved method, J. Food Sci. 74 (2009) M379–M383, https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x.
[16] A.L.M. Vigil, E. Palou, M.E. Parish, P.M. Davidson, Methods for activity assay and evaluation of results, Antimicrobials in Food 143 (2005) 659–680. Third Ed.
[17] F.C. Odds, Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them, J. Antimicrob. Chemother. (2003) 1. England.
[18] L.A. Barbee, O.O. Soge, K.K. Holmes, M.R. Golden, In vitro synergy testing of novel antimicrobial combination therapies against Neisseria gonorrhoeae, J. Antimicrob. Chemother. 69 (2014) 1572–1578, https://doi.org/10.1093/jac/dkt540.
[19] C. Gan, E. Langa, A. Valenzuela, D. Ballestero, M.R. Pino-Otín, Synergistic activity of thymol with commercial antibiotics against critical and high WHO priority pathogenic bacteria, Plants 12 (2023) 1868, https://doi.org/10.3390/plants12091868.
[20] Z.Q. Hu, W.H. Zhao, N. Asano, Y. Yoda, Y. Hara, T. Shimamura, Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 558–560, https://doi.org/10.1128/aac.46.2.558-560.2002.
[21] J. An, G.Y. Zuo, X.Y. Hao, G.C. Wang, Z.S. Li, Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Phytomedicine 18 (2011) 990–993, https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.02.013.
[22] J. Pollard, J. Snarr, V. Chaudhary, J. Jennings, H. Shaw, B. Christiansen, J. Wright, In vitro evaluation of the potential for resistance development to ceragenin CSA-13, Journal Antimicrobial Chemotherapy 67 (2012) 2665–2672, https://doi.org/10.1093/jac/dks276.
[23] G. Wang, J. Brunel, M. Preusse, N. Mozaheb, S. Willger, G. Larrouy-Maumus, P. Baatsen, S. Häussler, J. Bolla, F. Van Bambeke, The membrane-active polyaminoisoprenyl compound NV716 re-sensitizes Pseudomonas aeruginosa to antibiotics and reduces bacterial virulence, Commun. Biol. 5 (2022) (2022) 871, https://doi.org/10.1038/s42003-022-03836-5.
[24] C. Clark, Resistance selection studies comparing the activity of razupenem (PTZ601) to vancomycin and linezolid against eight methicillinresistant and two methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains, Antimicrob. Agents Chemother. 53 (2009) 3118–3121, https://doi.org/10.1128/AAC.00183-09.
[25] D.J. Farrell, M. Robbins, W. Rhys-Williams, W. Love, Investigation of the potential for mutational resistance to XF-73, retapamulin, mupirocin, fusidic acid, daptomycin, and vancomycin in methicillin-ResistantStaphylococcus aureusIsolates during a 55-passage study, Antimicrob. Agents Chemother. 55 (2010) 1177–1181, https://doi.org/10.1128/AAC.01285-10.
[26] WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide Research, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance, World Health Organization, Geneva, 2024.
[27] E.A. Erdogan Eliuz, Antimicrobial activity and mechanism of essential oil of endemic salvia hypargeia finc. & mey. In Turkey, Indian J. Microbiol. 61 (2021) 291–297, https://doi.org/10.1007/s12088-021-00939-1.
[28] B. Rym, H. Youcef, D. Abdelghani, H. Karim, Chemical characterization, evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of Algerian (myrtus communis L), Prog. Nutr. 24 (2022), https://doi.org/10.23751/pn.v24i1.11721.
[29] V. Srisukh, C. Tribuddharat, V. Nukoolkarn, N. Bunyapraphatsara, K. Chokephaibulkit, S. Phoomniyom, S. Chuanphung, S. Srifuengfung, Antibacterial activity of essential oils from Citrus hystrix (makrut lime) against respiratory tract pathogens, Sci. Asia 38 (2012) 212–217, https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.212.
[30] A.R. Freire, D.E. Wanderley Gomes Freire, S.A. de Sousa, E.M. Serpa, L.d.F. Dantas de Almeida, Y.W. Cavalcanti, Antibacterial and solubility analysis of experimental phytotherapeutic paste for endodontic treatment of primary teeth, Pesqui. Bras. em Odontopediatria Clínica Integr. 21 (2021), https://doi.org/10.1590/pboci.2021.005.
[31] T.-S. Yang, L.K.-P. Chao, T.-T. Liu, Antimicrobial activity of the essential oil of Glossogyne tenuifolia against selected pathogens, J. Sci. Food Agric. 94 (2014) 2965–2971, https://doi.org/10.1002/jsfa.6641.
[32] S.O. Oyedemi, A.I. Okoh, L.V. Mabinya, G. Pirochenva, A.J. Afolayan, The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, alpha-terpineol and gamma-terpinene against Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris and Escherichia coli, Afr. J. Biotechnol. 8 (2009) 1280–1286.
[33] D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano, Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, Antimicrob. Agents Chemother. 49 (2005) 2474–2478, https://doi.org/10.1128/aac.49.6.2474-2478.2005.
[34] J. Sikkema, J.A.M. Debont, B. Poolman, Interactions of cyclic hydrocarbons with biological-membranes, J. Biol. Chem. 269 (1994) 8022–8028.
[35] L. Li, C. Shi, Z. Yin, R. Jia, L. Peng, S. Kang, Z. Li, Antibacterial activity of α-terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*, Braz. J. Microbiol. 45 (2014) 1409–1413, https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400035.
[36] M. Simoes, R.N. Bennett, E.A.S. Rosa, Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms, Nat. Prod. Rep. 26 (2009) 746–757, https://doi.org/10.1039/b821648g.
[37] X. Li, W. Zhang, Y. Qin, X. Xing, Essential oil from *Hedyotis chrysotricha:* chemical composition, cytotoxic, antibacterial properties and synergistic effects with streptomycin, Record Nat. Prod. 16 (2022) 376–381, https://doi.org/10.25135/rnp.279.2108.2168.
[38] F.R.S. Mendes, F.G.E. Silva, E.O. Sousa, F.F.G. Rodrigues, J.G.M. Costa, F.J.Q. Monte, T.L.G. Lemos, J.C.C. Assuncao, Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers. B.L. Burtt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics, J. Essent. Oil Res. 27 (2015) 259–263, https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1014935.

[39] D. Al Tawalbeh, T. Aburjai, Q. Al Balas, A. Al Samydai, *In silico* and *in vitro* investigation of anti *Helicobacter* activity of selected phytochemicals, J. Pharm. BioAllied Sci. 14 (2022) 132–139, https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_850_21.
[40] J. Chadha, Ravi, J. Singh, K. Harjai, α-Terpineol synergizes with gentamicin to rescue *Caenorhabditis elegans* from *Pseudomonas aeruginosa* infection by attenuating quorum sensing-regulated virulence, Life Sci. 313 (2023), https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121267.
[41] J. Qiu, X. Niu, J. Dong, D. Wang, J. Wang, H. Li, M. Luo, S. Li, H. Feng, X. Deng, Baicalin protects mice from *Staphylococcus aureus* pneumonia via inhibition of the cytolytic activity of α-hemolysin, JID (J. Infect. Dis.) 206 (2012) 292–301, https://doi.org/10.1093/infdis/jis336.
[42] J. Dong, J. Qiu, J. Wang, H. Li, X. Dai, Y. Zhang, X. Wang, W. Tan, X. Niu, X. Deng, S. Zhao, Apigenin alleviates the symptoms of Staphylococcus aureus pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin, FEMS Microbiol. Lett. 338 (2013) 124–131, https://doi.org/10.1111/1574-6968.12040.
[43] T. Suganya, I.A.S.V. Packiavathy, G.S.B. Aseervatham, A. Carmona, V. Rashmi, S. Mariappan, N.R. Devi, D.A. Ananth, Tackling multiple-drug-resistant bacteria with conventional and complex phytochemicals, Front. Cell. Infect. Microbiol. 12 (2022), https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.883839.
[44] M.K. Dassanayake, T.-J. Khoo, J. An, Antibiotic resistance modifying ability of phytoextracts in anthrax biological agent *Bacillus anthracis* and emerging superbugs: a review of synergistic mechanisms, Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 20 (2021), https://doi.org/10.1186/s12941-021-00485-0.
[45] R. Kaur, A. Tiwari, M. Manish, I.K. Maurya, R. Bhatnagar, S. Singh, Common garlic (*Allium sativum* L.) has potent Anti-*Bacillus anthracis* activity, J. Ethnopharmacol. 264 (2021), https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113230.
[46] D.A. Vattem, Y.T. Lin, R. Ghaedian, K. Shetty, Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections, Process Biochemistry 40 (2005) 1583–1592, https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.024.
[47] R.K. Chandrakanth, S. Raju, S.A. Patil, Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates, Curr. Microbiol. 56 (2008) 558–562, https://doi.org/10.1007/s00284-008-9123-y.
[48] C. Wu, X. Zhang, J. Liang, Q. Li, H. Lin, C. Lin, H. Liu, D. Zhou, W. Lu, Z. Sun, X. Lin, H. Zhang, K. Li, T. Xu, Q. Bao, J. Lu, Characterization of florfenicol resistance genes in the coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) isolates and genomic features of a multidrug-resistant *Staphylococcus lentus* strain H29, Antimicrob. Resist. Infect. Control 10 (2021), https://doi.org/10.1186/s13756-020-00869-5.
[49] W.T. Langeveld, E.J.A. Veldhuizen, S.A. Burt, Synergy between essential oil components and antibiotics: a review, Crit. Rev. Microbiol. 40 (2014) 76–94, https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.763219.
[50] D. Al-Sallami, A. Alsultan, K.H. Abbas, S.R. Clarke, Evaluation of efflux pump inhibitory activity of some plant extracts and using them as adjuvants to potentiate the inhibitory activity of some antibiotics against Staphylococcus aureus, Open Vet. J. 13 (2023) 42–47, https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i1.5.
[51] S.J. Wright, P. Caunt, D. Carter, P.B. Baker, Microbial oxidation of alpha-pinene by serratia-marcescens, Appl. Microbiol. Biotechnol. 23 (1986) 224–227.
[52] S.-X. Ge, J.-X. Li, Z.-H. Jiang, S.-X. Zong, L.-L. Ren, Cradle for the newborn *Monochamus saltuarius*: microbial associates to ward off entomopathogens and disarm plant defense, Insect Sci. 30 (2023) 1165–1182, https://doi.org/10.1111/1744-7917.13148.
[53] M. Howe, K. Keefover-Ring, K.F. Raffa, Pine engravers carry bacterial communities whose members reduce concentrations of host monoterpenes with variable degrees of redundancy, specificity, and capability, Environ. Entomol. 47 (2018) 638–645, https://doi.org/10.1093/ee/nvy032.
[54] L.-T. Xu, M. Lu, J.-H. Sun, Invasive bark beetle-associated microbes degrade a host defensive monoterpene, Insect Sci. 23 (2016) 183–190, https://doi.org/10.1111/1744-7917.12255.
[55] H. Nikaido, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67 (2003) 593, https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003.
[56] Q.Y. Lin, Y.-L. Tsai, M.-C. Liu, W.-C. Lin, P.-R. Hsueh, S.-J. Liaw, *Serratia marcescens arn*, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance, Antimicrob. Agents Chemother. 58 (2014) 5181–5190, https://doi.org/10.1128/aac.00013-14.
[57] Food and Drug Administration, 21 CFR §175.105 Adhesives, U.S. Government, Washington (DC), 2025 [Internet].
[58] J.A. Cuaron, S. Dulal, Y. Song, A.K. Singh, C.E. Montelongo, W. Yu, V. Nagarajan, R.K. Jayaswal, B.J. Wilkinson, J.E. Gustafson, Tea tree oil-induced transcriptional alterations in Staphylococcus aureus, Phytother Res. 27 (2013) 390–396, https://doi.org/10.1002/ptr.4738.
[59] I. Kyriakidis, E. Vasileiou, Z.D. Pana, A. Tragiannidis, *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms, Pathogens 10 (2021), https://doi.org/10.3390/pathogens10030373.
[60] R. Vazquez-Lopez, S.G. Solano-Galvez, J.J.J. Vignon-Whaley, J.A.A. Vaamonde, L.A.P. Alonzo, A.R. Resendiz, M.M. Alvarez, E.N.V. Lopez, G. Franyuti-Kelly, D. A. Alvarez-Hernandez, V.M. Guzman, J.E.J. Banuelos, J.M. Felix, J.A.G. Barrios, T.B. Fortes, *Acinetobacter baumannii* resistance: a real challenge for clinicians, Antibiotics (Basel) 9 (2020), https://doi.org/10.3390/antibiotics9040205.
[61] J. Davies, AMINOGLYCOSIDE-MODIFYING enzymes, Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 17 (1979) 137, 137.
[62] F. Tavares-Carreon, K. De Anda-Mora, I.C. Rojas-Barrera, A. Andrade, *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review, PeerJ 11 (2023), https://doi.org/10.7717/peerj.14399.
[63] H. Maseda, Y. Hashida, R. Konaka, A. Shirai, H. Kourai, Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*, Antimicrob. Agents Chemother. 53 (2009) 5230–5235, https://doi.org/10.1128/aac.00631-09.
[64] S. Schwarz, C. Kehrenberg, B. Doublet, A. Cloeckaert, Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol, FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev. 5 (2004) 519–542, https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001.
[65] B. Mlynarczyk-Bonikowska, C. Kowalewski, A. Krolak-Ulinska, W. Marusza, Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*, Int. J. Mol. Sci. 23 (2022), https://doi.org/10.3390/ijms23158088.
[66] S.S. Costa, C. Ferreira, R. Ribeiro, A.T. Fessler, A.-K. Schink, K. Kadlec, H. Kaspar, A. Amaro, T. Albuquerque, P. Abrantes, C. Morais, C. Pomba, S. Schwarz, I. Couto, Proposal of epidemiological cutoff values for apramycin 15 μg and florfenicol 30 μg disks applicable to *Staphylococcus aureus*, Microb. Drug Resist. 27 (2021) 1555–1559, https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0402.
[67] Z. Liu, X. Jiang, J. Li, W. Ji, H. Zhou, X. Gong, B. Miao, S. Meng, L. Duan, Q. Shi, X. Han, P. Gao, C. Chang, A. Dong, J. Li, Molecular characteristics and antibiotic resistance mechanisms of clindamycin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in China, Front. Microbiol. 14 (2023), https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1138039.
[68] O. Chacon, N. Forno, L. Lapierre, R. Munoz, M. Fresno, B. San Martin, Effect of *Aloe barbadensis Miller* (Aloe vera) associated with beta-lactam antibiotics on the occurrence of resistance in strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*, European Journal of Integrative Medicine 32 (2019), https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.100996.
[69] N.A. Mahizan, S.-K. Yang, C.-L. Moo, A.A.-L. Song, C.-M. Chong, C.-W. Chong, A. Abushelaibi, S.-H.E. Lim, K.-S. Lai, Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens, Molecules 24 (2019), https://doi.org/10.3390/molecules24142631.
[70] K.J.S.D.O. Dias, G.M. Miranda, J.R. Bessa, A.C.J. De Araujo, P.R. Freitas, R.S. De Almeida, C.L.R. Paulo, J.B.D.A. Neto, H.D.M. Coutinho, J. Ribeiro-Filho, Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: a systematic review, Front. Pharmacol. 13 (2022), https://doi.org/10.3389/fphar.2022.953982.

Anexos BLOQUE III

Anexo 3.1

toxics

MDPI

Article

Hydroquinone Ecotoxicity: Unveiling Risks in Soil and River Ecosystems with Insights into Microbial Resilience

Antonio Valenzuela, Diego Ballestero, Cristina Gan, Guillermo Lorca, Elisa Langa and María Rosa Pino-Otín *

Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, 50830 Zaragoza, Spain; avalenzuela@usj.es (A.V.); dballestero@usj.es (D.B.); cgan@usj.es (C.G.); glorca@usj.es (G.L.); elanga@usj.es (E.L.)
* Correspondence: rpino@usj.es

Abstract: Despite widespread industrial use, the environmental safety of hydroquinone (HQ), a benzene compound from plants used in processes like cosmetics, remains uncertain. This study evaluated the ecotoxicological impact of HQ on soil and river environments, utilizing non-target indicator organisms from diverse trophic levels: *Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri*, *Allium cepa*, and *Eisenia fetida*. For a more environmentally realistic assessment, microbial communities from a river and untreated soil underwent 16S rRNA gene sequencing, with growth and changes in community-level physiological profiling assessed using Biolog EcoPlate™ assays. The water indicator *D. magna* exhibited the highest sensitivity to HQ (EC_{50} = 0.142 µg/mL), followed by *A. fischeri* (EC_{50} = 1.446 µg/mL), and *A. cepa* (LC_{50} = 7.631 µg/mL), while *E. fetida* showed the highest resistance (EC_{50} = 234 mg/Kg). Remarkably, microbial communities mitigated HQ impact in both aquatic and terrestrial environments. River microorganisms displayed minimal inhibition, except for a significant reduction in polymer metabolism at the highest concentration (100 µg/mL). Soil communities demonstrated resilience up to 100 µg/mL, beyond which there was a significant decrease in population growth and the capacity to metabolize carbohydrates and polymers. Despite microbial mitigation, HQ remains highly toxic to various trophic levels, emphasizing the necessity for environmental regulations.

Keywords: hydroquinone; acute toxicity; *Daphnia magna*; *Aliivibrio fischeri*; *Allium cepa*; *Eisenia fetida*; microbial communities

check for updates

Citation: Valenzuela, A.; Ballestero, D.; Gan, C.; Lorca, G.; Langa, E.; Pino-Otín, M.R. Hydroquinone Ecotoxicity: Unveiling Risks in Soil and River Ecosystems with Insights into Microbial Resilience. *Toxics* **2024**, *12*, 115. https://doi.org/10.3390/toxics12020115

Academic Editor: Fayuan Wang

Received: 21 December 2023
Revised: 22 January 2024
Accepted: 23 January 2024
Published: 29 January 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Hydroquinone (HQ) is an aromatic compound found in various forms as a natural product from plants and animals [1]. It also has widespread applications in human and industrial activities, likely serving as the major benzene metabolite.

HQ serves various applications as a reducing agent in photographic developers, an antioxidant, and a polymerization inhibitor in the production of monomers, polymers, dyes, pigments, rubber products, and various chemicals. Historically, it has been used in the cosmetics industry for applications such as skin lightening, hyperpigmentation treatment, anti-aging products, sunscreen formulations, coating fingernails, and hair dyes.

However, according to the harmonized classification and labelling (ATP01) ap-proved by the European Union (European Chemical Agency, ECHA) [2], this substance can cause serious health damage, including genetic defects, and its cosmetic use is prohibited by Regulation (EC) No. 1223/2009, with exceptions such as professional uses (hair dyeing and artificial nail systems). Since the 1960s, it has also been used as a medical product in topical treatments for acne scars, post-inflammatory hyperpigmentation, and certain types of dermatitis, and this use continues to be authorized by the European Medicines Agency (EMA) and the Food and Drug Administration (FDA) [3] in pharmaceutical and over-the-counter products (Medical Pharmaceutical Formulary, PharmaBooks, 2010).

While there is a minor natural release of HQ by plants and animals, industrial uses and their discharges are the main cause of the dispersion of HQ into the environment [4–6].

Although numerous techniques have been developed for its detection, there are not many studies that reveal concentrations at which this product can be found in the environment. HQ has been detected in bleachery effluents from kraft pulp production [4] at concentrations up to 40 μg/L and as an intermediate metabolite in many other effluents such as phenolic resins [5] and organophosphate esters [6]. Moreover, HQ is the key intermediate of many degradation pathways, such as paracetamol [7,8], bisphenol A [9], or the disinfectant chlorophene [10] among many others. In acetaminophen-contaminated sludge from wastewater purification plants, HQ is one of the most commonly detected intermediates [11]. Additionally, the formation of HQ and other derivatives in the early stages of phenol oxidation appears to increase the toxicity of phenolic wastewaters, making HQ more toxic than the initial product [12,13].

Wastewater containing this product ends up in watercourses. Thus HQ has been detected in river water at different sampling sites and in different months [14,15] at concentrations up to 1000 μg/L and even at similar concentrations in tap water [16,17]. It has also been detected in stream water near public landfills [18].

In addition to these pathways, other routes can carry this product to the soil. For example, HQ has been shown to be a byproduct of the degradation of the pesticide pentachlorophenol, dispersed globally in soils [19] as well as he commonly used herbicide fenoxaprop-p-ethyl [20]. HQ is also applied to soil as a urease inhibitor [21].

The classification provided by companies to ECHA in the European Union regulation Registration REACH [22] (Authorization, and Restriction of Chemicals) identifies this substance as highly toxic to aquatic life with long-lasting effects.

Some studies show high HQ toxicity to aquatic organisms, including algae (EC_{50}: 50 to 11,000 μg/L) [23], with cyanobacterial species (such as *Microcystis aeruginosa*) being much more susceptible than coccal green algal species. Green musk chara exhibited phytotoxicity at 1.1 μg/L [24]. HQ is also toxic to mollusks [25] and adverse effects are documented in fish species, e.g., zebrafish embryos (EC_{50}: 3.2 mg/L to < 0.1 mg/L) [26], rainbow trout, and fathead minnows [27,28].

Little is known about the effect of HQ on terrestrial invertebrates. It appears to be toxic to snails [29] and insects such as *Apis mellifera* [30]. Phytotoxic effects have also been reported on plants of the genus *Vallisneria* and *Lemna*. HQ was lethal to rice above 5 mM [24] and acts by inhibiting germination of *Cucuvis sativus* seeds (103.9 mg/L of HQ inhibits 50% of seeds germination) [31].

Few studies have examined HQ's impact on entire environmental communities. Some focus on its effects on microbial communities in wastewater treatment plants [32–35], however little is known about its ecotoxicity in river or edaphic microbial communities.

HQ has been proposed as a urease inhibitor in agricultural soils to minimize ammonia volatilization, enhancing nitrogen utilization efficiency for plant benefit [21]. This would be another route of entry of HQ into soil systems. Limited evidence suggests minor impacts on soil microorganism community structure when used alone or in combination with other urease inhibitors [36,37].

Therefore, despite the apparent toxicity of this product and its abundant dispersion in the environment, there are still gaps in the interpretation of the HQ impact on the environment through individual non-target indicators. Moreover, studies that include communities of organisms such as bacteria and have a more realistic environmental point of view are lacking. To maintain a healthy ecosystem, it is crucial to adopt an integrated approach that considers not only individual species but also their interconnected relationships, as multiple species coexist closely within it.

Therefore, the objectives of this study are:

(a) To evaluate the toxicity of HQ on key indicator organisms in soil and water for which little information exists.
(b) To evaluate for the first time the toxicity of HQ on 16 S rRNA gene-sequenced fluvial and soil microbial communities in order to more realistically assess the impact on these environments.

Thus, by studying the impact of HQ on different trophic levels, individuals, and communities, we can obtain a complete perspective of the impact of this compound on the environment.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

HQ (CAS: 123-31-9) was obtained from Acofarma (Barcelona, Spain) with a purity of 99.5%. Table 1 shows the main properties of HQ.

Table 1. Physical and chemical properties of hydroquinone.

Hydroquinone Properties	
Molecular weight	110.11 g/mol [38]
Water solubility	73 g/L at 25 °C [38]
Melting point	170–172 °C [38]
Boiling point	287 °C [38]
Dipole moment	1.4–2.4 D [38]
Density	1341 kg/m [39]
Vapour pressure	2.34×10^{-3} Pa at 25 °C [39]
pH stability	4.0–7.0 [39]
Partition coefficient (log p_{ow})	0.59 [40]
pK_a	$pK_1 = 9.9$ $pK_2 = 11.6$ [40]

2.2. Daphnia Magna Assay

The impact of HQ on *D. magna* was investigated following the standard procedure outlined in Daphtoxkit FTM magna (1996), reference DM121219 from Vidrafoc (Barcelona, Spain), and in accordance with OECD 202 (2004) [41] guidelines. The kit was stored in darkness at 5 °C until use. Initially, *D. magna* eggs were incubated at 22 °C under 6000 lx light conditions using a TOXKIT model CH-0120D-AC/DC incubator (ECOTEST, Valencia, Spain) for 72 h. Subsequently, neonates were fed with one vial of spirulina microalgae for 2 h and exposed to solutions of HQ at concentrations of 0.01, 0.1, 0.5, 1, and 2 µg/mL, dissolved in synthetic freshwater (ISO 6341, 2012) [42], for 24 h in the same incubator but under complete darkness.

The pH was maintained between 7–7.5, rendering adjustments unnecessary. Each concentration was evaluated using 5 replicates, each containing 5 organisms, with synthetic freshwater serving as the negative control. After 24 h of exposure, daphnias showing no movement for 15 s after gentle agitation were considered immobile. The obtained results were utilized to calculate the LC_{50}, representing the concentration of the compound resulting in 50% lethality.

2.3. Aliivibrio Fischeri Assay

The assessment of *A. fischeri* acute toxicity was carried out by evaluating bioluminescence inhibition caused by the presence of HQ, in accordance with the established protocol outlined in (ISO 11348-3, 2007) [43]. The strain utilized for this analysis was *A. fischeri* NRRL-B-11,177, obtained from Macherey-Nagel (ref. 945 006, Dueren, Germany). Lyophilized *A. fischeri* were reconstituted using the provided reactivation solution and stored at 4 °C for 5 min.

HQ stock solutions were prepared using a 2% NaCl stock solution at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, and 1000 µg/mL. Solutions did not require pH adjustment. The assay was conducted in quadruplicate, in four tubes containing bacteria and each HQ concentration solution, and one tube with just a 2% NaCl stock solution serving as the negative control.

To initiate the assay, baseline luminescence was measured. Subsequently, 0.5 mL of each HQ dilution prepared for testing was added to the corresponding tubes. Within the recommended time frame specified by the standard, after a 30-min incubation period, the second measurement of luminescence inhibition was conducted. Measurements were recorded using a Biofix® Lumi-10 luminometer (Macherey-Nagel, Dueren, Germany).

The test endpoint was determined by the reduction in bacterial light production. The EC_{50} values were expressed as a percentage of luminescence inhibition and calculated in comparison to the control.

2.4. Allium cepa Assay

Bulbs from the *A. cepa* species, specifically the Stuttgarter Riesen variety with a 14/21 gauge, were obtained from the Fitoagrícola Company (Castellón, Spain). In the preparatory phase of the experimental setup, the young bulbs underwent a peeling process to ensure the preservation of root ring integrity. Acute toxicity experiments involving *A. cepa* were conducted following the methodology outlined by Fiskesjö [44].

The bulbs were carefully arranged in 15 mL tubes, and mineral water (Aguas de San Martín de Veri S.A., Huesca, Spain) was selected as the growth medium due to its suitable calcium and magnesium content, as detailed on the product's official website (https://www.veri.es/es/el-producto, accessed on 10 April 2023). Ecotoxicological tests were conducted with 12 replicates for each concentration: 0.03, 0.3, 3.0, 30, and 300 mg/L. The negative control consisted of water alone. The bulbs were cultivated in an incubator under light conditions at a temperature of 25 °C for a duration of 72 h, with the test solutions being refreshed every 24 h. The endpoint for assessment was the measurement of root growth inhibition, and the EC_{50} was calculated as part of the analysis.

2.5. Eisenia Fetida Assay

Mature individuals of *E. fetida* were obtained from composters located at Todo Verde (Madrid, Spain). Prior to the commencement of the tests, the earthworms underwent a 15-day acclimatization period in a substrate conditioned with sphagnum peat provided by the Spanish Flowers Company (Barcelona, Spain). The earthworms were carefully maintained under stable environmental conditions, specifically at a temperature range of 18–25 °C, pH levels between 7.5–8, and humidity levels maintained at 80–85%.

For the ecotoxicity assessment, adult earthworms aged above 60 days, with clitellum, and weighing between 300–600 mg, were selectively chosen for the experiments. The toxicity tests adhered to the guidelines outlined in OECD 207 (1984) [45] methodology, as previously detailed in research [46]. These tests were conducted in a standardized soil substrate comprising quarzitic sand and kaolinic clay (both from Imerys Ceramics España, S.A., Castellón, Spain), and sphagnum peat (Verdecora vivarium, Zaragoza, Spain) in a proportionate ratio of 7:2:1.

Polypropylene containers, equipped with perforated lids to facilitate ventilation and minimize moisture loss, were used for the experiments. Each container was filled with 600 mg of the artificial soil mixture. Within each container, ten earthworms were placed alongside HQ solutions, with final concentrations set at 0.1, 1.0, 10, 100, and 1000 mg/Kg. The moisture content of the substrate was adjusted to 35–45% of the dry soil weight using deionized water. Negative controls were established following the same procedural steps but without the inclusion of HQ. Each concentration level was subjected to triplicate testing.

Throughout the experimental period, the containers were carefully maintained under controlled environmental conditions, specifically at a temperature of 20 ± 2 °C, relative humidity ranging between 80–85%, and light intensity maintained at 400–800 lx. The assessment of earthworm mortality was conducted 14 days after the initiation of treatment, and subsequently, the LC50 values were calculated.

2.6. River and Soil Microorganisms Community Assay

2.6.1. River Samples

In October 2022, water samples were collected from the Gallego River (Zaragoza, Spain) for genetic and chemical analyses, along with Biolog EcoPlates™ assays (Tiselab S.L., Barcelona, Spain) and transported to the laboratory following ISO 19458:2006 [47] procedures by AENOR. In situ measurements revealed a water temperature of 17 °C using a Nahita thermometer (ICT S.L., La Rioja, Spain), pH 7.5 determined with PanReac AppliChem A011435 (Darmstadt, Germany), and a conductivity of 2.8 mS measured with a

Hanna HI8733 (Merck Madrid, Spain) conductivity meter. Analysis of the river water can be seen in Table A1.

For genetic analysis, microorganisms were obtained from 5 L of river water, filtered through a 0.22 µm cellulose nitrate filter Sartorius (Göttingen, Germany) using a vacuum flask. The filtered microorganisms were reconstituted in a sterile Falcon tube with 50 mL of phosphate-buffered saline (PBS), subjected to centrifugation at 5000× *g* for 10 min, and the resulting pellet preserved at −80 °C for subsequent sequencing.

To prepare for ecotoxicity assays, 1 L of river water underwent filtration through a 70 µm nylon sieve (Becton Dickinson, Madrid, Spain) to remove debris. The filtered water was stored at 4 °C in the dark until used in Biolog EcoPlates™ experiments. Additionally, two liters of the same water were promptly transported to Laboratorios Valero Analítica (Zaragoza, Spain) on the sampling day for physicochemical analysis (Table A1).

2.6.2. Soil Samples

In November 2022, soil samples were obtained from a pesticide-free crop field at the Agri-food Research and Technology Center of Aragon (CITA, Zaragoza, Spain). The soil analysis was conducted by the CITA Soil and Irrigation Unit, and detailed results are available in Table A2.

For genetic analysis, 20 g of soil was mixed with 100 mL of sterile water. After 30 min of stirring under sterile conditions and a settling period of 1 h, 10 mL of the sample underwent sonication for 1 min, followed by centrifugation at 1000× *g* for 10 min. In a sterile environment, the supernatant was collected, and soil microorganisms were isolated using a 0.22 µm cellulose nitrate filter (Sartorius Spain SA, Madrid, Spain) and a vacuum flask. The filter content was washed with sterilized PBS, followed by centrifugation at 5000× *g* for 10 min. The resulting pellets were collected and stored at −80 °C for subsequent sequencing.

Before ecotoxicity assays, 10 g of soil underwent preliminary sieving using a 2 mm sieve (Becton Dickinson, Madrid, Spain). The pre-sieved soil was mixed with 95 mL of sterile water in an Erlenmeyer flask for 30 min, followed by a settling period of 1 h. After settling, 10 mL of the upper portion of the flask was transferred to Falcon tubes, experiencing centrifugation at 1000× *g* for 10 min, with the sterile collection of the supernatant. This process was repeated five times, and the cumulative supernatant was passed through a 70 µm nylon sieve (Becton Dickinson, Madrid, Spain) to remove suspended soil debris, ensuring a purified sample suitable for inoculation in Biolog plates.

2.6.3. Genetic Sequencing of River and Soil Microorganisms

The preprocessed solution from the conclusion of Sections 2.6.1 and 2.6.2 underwent an additional filtration step utilizing Sartori 0.2 µm cellulose nitrate filters that had been thoroughly rinsed with a PBS (Phosphate Buffered Saline) solution with a pH of 7.5. The PBS solution was collected in Falcon tubes and centrifuged at 5000× *g* for 10 min. Following careful removal of the supernatants, the resulting pellets were frozen at −80 °C for subsequent genetic analysis using the Froilabo, Trust −80 °C system.

DNA extraction was performed employing the AllPrep® PowerViral® DNA/RNA Kit (QiaGen, Barcelona, Spain), following the manufacturer's guidelines. Subsequently, the purified DNA samples were quantified fluorimetrically using Picogreen®, and 1.5 ng of input DNA from each sample was employed to amplify the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. The V3-V4 specific PCR consisted of 21 cycles and was performed using Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and 100 nM primers. After amplification, positive 16S-derived bands were assessed through agarose gel electrophoresis, and DNA products were diluted. A second PCR, consisting of 13 cycles, was carried out in the presence of 400 nM primers, belonging to the Access Array Barcode Library for Illumina Sequencers (Fluidigm, CA, USA) collection. This second PCR finalizes the Illumina library construction and assigns each sample a unique barcode. Following individual library preparation, samples were assessed for size and concentration using a Tape Station (Agilent, Madrid, Spain), and an equimolar pool was created. The pool was purified using AMPure beads and quantified via quantitative PCR using the "Kapa-

SYBR FAST qPCR kit for LightCycler480" (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and a reference standard for quantification.

The pool of amplicons was denatured before being loaded onto a flowcell at a concentration of 10 pM, where clusters were formed and subjected to sequencing using a "MiSeq Reagent Kit v3" in a 2 × 300 pair-end sequencing run on a MiSeq sequencer.

The resulting fastq files were generated using the bcl2fastq tool integrated into the Illumina sequence workflow. Phylogenetic analysis was conducted using the 16S Metagenomics app of Base Space v1.1.0 (Illumina, Madrid, Spain), with Greengenes (13_5) serving as the database for taxonomic assignment.

2.6.4. Community-Level Physiological Profiling (CLPP) of River and Soil Microorganisms

To investigate the impact of HQ on the metabolic activity of microbial communities in water and soil, Biolog EcoPlate tests from Tiselab S.L. (Barcelona, Spain) were utilized. This method allowed monitoring changes in the utilization of 31 diverse carbon sources, as detailed in previous studies [48]. For ecotoxicity assessment, solutions containing HQ at varying concentrations (0.1, 10, and 100 µg/mL) were prepared in sterile water, each with a final volume of 150 µL, and added to the wells of a Biolog plate under sterile conditions.

Prefiltered river water (see Section 2.6.1) or the supernatant obtained from the soil sample (Section 2.6.2) was used for studying the metabolic activity of river and soil microorganisms, respectively. The pH of these solutions was maintained between 6 and 7. Each concentration was tested in triplicate, with all procedures conducted under sterile conditions within a flow chamber. After preparation, the plates were placed in the dark at a temperature of 25 °C for 7 days, ensuring sterile conditions throughout the experiment.

Optical density (OD) measurements at a wavelength of 590 nm were taken immediately after inoculation and then once daily. A Synergy H1 Microplate reader (BIO-TEK, Dallas, TX, USA) with Gen5™ (version 2.0) data analysis software was used for this purpose. The carbon utilization rate was determined by assessing the reduction of tetrazolium violet redox, following the method outlined by Pohland [49].

2.7. Statistics and Graphic Representation

To establish dose–response curves for *D. magna* mobility, *E. fetida* survival, *A. cepa* root elongation, and *A. fischeri* luminescence, logit logistic regression was applied using XLSTAT software (version 2014.5.03, Addinsoft 2024). This approach facilitated the calculation of LC_{50} and EC_{50} values, along with their corresponding standard errors (SE). The statistical significance of the dose–response models was assessed through a chi-squared test.

Microbial activity for each Biolog EcoPlate was quantified using Average Well Color Development (AWCD), following the methodology outlined by Garland and Mills [50], as cited in previous studies [51].

Graphical representations of the results were generated using appropriate visualization techniques, and Equation (1) was employed:

$$AWCD = \sum_{i=0}^{i=7} (OD_{t=xi} - OD_{t=x0}) \quad (1)$$

OD_i represents the optical density value from each well at any given time after subtracting the $OD_{t\ =\ X0}$ from the $OD_{t\ =\ Xi}$ of that well.

The relationship between AWCD values from the three replicates and the significance of differences were assessed using a Student's *t*-test for two independent samples, performed with XLSTAT software (version 2014.5.03). The coefficient of variation (CV) is used to assess the relative dispersion of absorbance data in the three replicates.

Finally, AWCD curves were fitted to a logistic model (Equation (2)) for sigmoid microbial growth, as described in previous studies [52] using the Excel Solver (Microsoft 365) complement:

$$AWCD = \frac{Cmax}{1 + e^{b-rt}} \quad (2)$$

Here, *Cmax* represents the carrying capacity or the maximum achievable population density, *r* is the intrinsic rate of population increase, and *b* is a fitting parameter.

3. Results and Discussion

3.1. Impact of Hydroquinone on Daphnia magna

Figure 1a shows the *D. magna* dose–response curve to HQ.

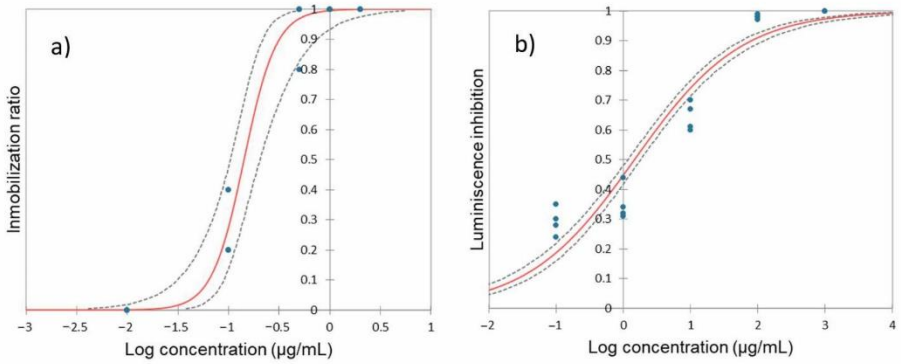


Figure 1. Dose–response curve for (**a**) *Daphnia magna* and for (**b**) *Aliivibrio fischeri* after 24 h and 30 min of exposure to hydroquinone, respectively. Red line represents the model and dashed lines indicate the confidence limits (95%). The points indicate the values of the replicates, in some cases the values may overlap.

The calculated $EC_{50\ 24\ h}$ for HQ is 0.142 (0.104–0.204) µg/mL, indicating high toxicity of this product on *D. magna*. The toxic effects of HQ on this organism have been documented in previous studies [53] and when calculating the EC_{50}, the values obtained after 24 h of exposure, are very similar to ours, with EC_{50} = 0.150 µg/mL [54,55]. After 48 h of exposure, values are slightly higher at 0.25–0.28 µg/mL [20]. Interestingly, another aquatic crustacean species, also belonging to Branchiopoda, *Ceriodaphnia dubia*, shows a very similar sensitivity to HQ as *D. magna* with EC_{50} values of 0.15 µg/mL as well [27].

D. magna is a good indicator of water quality since it is exposed to toxics through a dual pathway: surface exposure and also through its diet as it is a filter-feeding organism. HQ is a relatively small molecule (MW = 110.11 g/mol) and electrically neutral, with a pKa of approximately 9.9 and 11.6 [40], which might facilitate its passage through cell membranes. Changes in membrane permeability can affect the integrity of the cell membranes of *D. magna*, subsequently altering cellular homeostasis and leading to cell death. However, it is not a very lipophilic compound (LogKow = 0.59) [40].

On the other hand, it is soluble in water (73 g/L at 25 °C) [38] which enhances its bioavailability. Therefore, the digestive tract may be the main route of exposure to these organisms, facilitating the entry of HQ into *D. magna*, which could lead to cardiac [56] and nervous [57] disturbances. It could also act by inducing oxidative stress [58] or affecting the protein content in the hemolymph, as observed in other invertebrates [59]. Similar to benzene, HQ can inhibit the activity of certain enzymes such as topoisomerase II [60], negatively impacting essential cellular processes for the survival of *D. magna*. This, in conjunction, would explain the high toxicity of HQ observed on this organism.

3.2. Impact of Hydroquinone on A. fisheri

The toxicity of HQ to the bacteria *A. fischeri* is illustrated in Figure 1b and the obtained EC_{50} was 1.446 (1.155–1.796) µg/mL. Limited data exist on the toxicity of HQ to *A. fischeri*, as studies typically focus on the toxicity of byproducts, including HQ, generated during the decomposition of various products such as paracetamol [61], benzidine [62], benzoquinone [63], sulfamethoxazole [64], sulfanilamide [65] or clofibric acid [66] among

others. It is noteworthy that almost all studies agree that HQ is one of the most toxic byproducts, even more than the original product.

The EC_{50} value for *A. fischeri* exposed to HQ (as dimethomorph intermediate on TiO_2 suspension) in a 2% NaCl solution was measured at 0.08 mg/L [67] but the exposure time was only 5 min. A. Santos et al. [68] reported an EC_{50} of 0.041 mg/L (15 min) in *A. fischeri* during the catalytic oxidation of phenol. These results are challenging to compare due to different experimental conditions, and in our case, the exposure was for 30 min. Nevertheless, all results suggest that HQ is highly toxic to this aquatic indicator.

The Gram-negative outer covering of *A. fischeri* may partially shield the bacterium from intracellular exposure to HQ, acting as a selective barrier. Due to its size, HQ may face challenges in traversing the porins of the outer membrane of the Gram-negative wall or interacting with its lipopolysaccharides. Alternatively, it could be expelled by efflux pumps. This may explain its somewhat lower toxicity compared to *D. magna*. However, once inside the prokaryotic cell, it is likely to have toxicity mechanisms similar to those observed in *D. magna*.

To the best of our knowledge, no information is available regarding the mechanism of action of HQ on *A. fisheri.* However, documented inhibitory effects on the growth of pathogenic bacteria such as *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* have been reported [69–71]. Additionally, studies on other bacteria within the genus *Aliivibrio* [72,73] observed antimicrobial activity of HQ derivatives. Interestingly, these derivatives appear to downregulate genes of *Aliivibrio* spp. implicated in motility, protease synthesis, indol, and capsular polysaccharide production, suggesting a potential mechanism of action [72].

The substantial impact of HQ on both *A. fischeri* and *D. magna* suggests potentially significant effects on river ecosystems. However, assessing its effects on complete communities, such as microbial ones, is essential for a more realistic diagnosis.

In Figure 2, the genetic sequencing of river microbial communities can be seen.

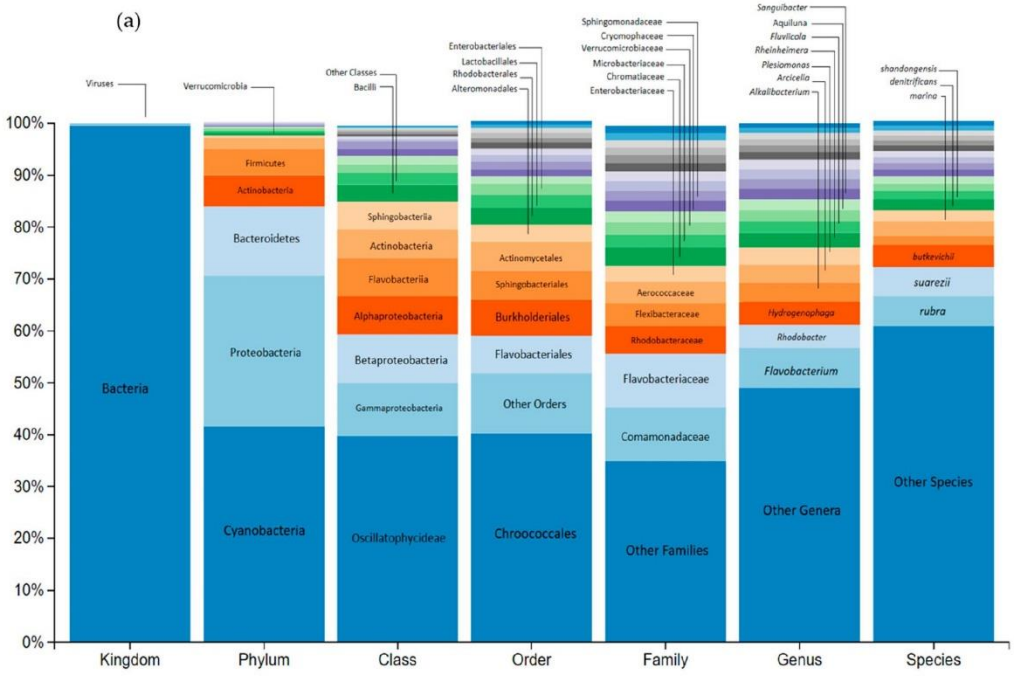


Figure 2. *Cont.*

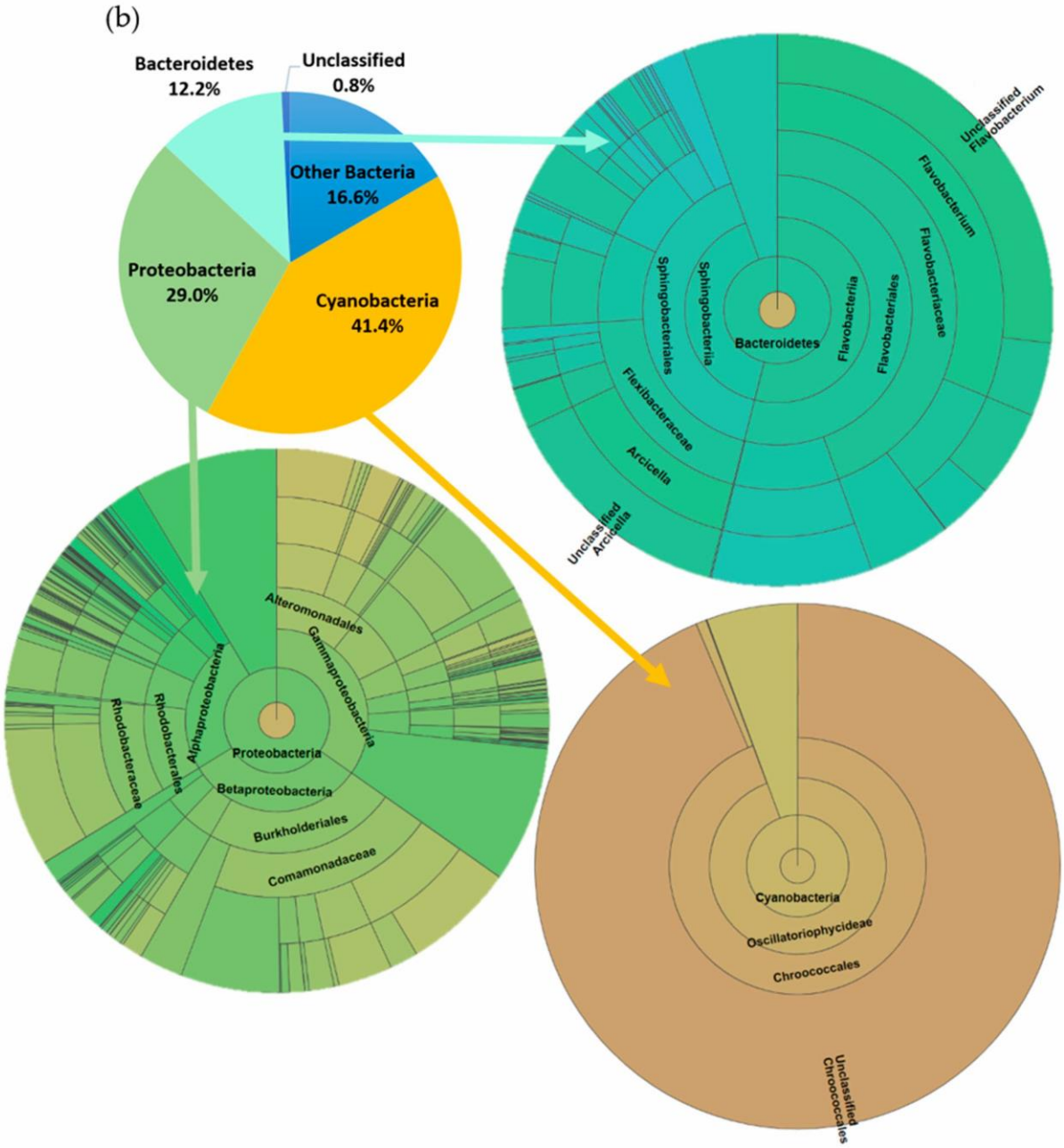


Figure 2. (**a**) Relative abundance of genetically sequenced microorganisms from a river, within their taxonomic classifications at each level. (**b**) Illustration of phyla that are most prominently observed in the river.

3.3. Impact on River Microbial Communities: Growth and Community-Level Physiological Profiling (CLPP)

Figure 2 shows that river microorganism sequencing generated a total of 65,615 reads, all of which passed quality filters with a 100% success rate. Sequencing comprehensively covered all taxonomic levels, achieving >95% for phylum, class, and order, >50% for family

and genus, and 23.33% for species. Figure 2a displays the most prevalent taxa (>2%) for river microorganisms at each taxonomic level. In Figure 2b, a visual representation is provided, illustrating the most prominently observed phyla with pie chart slices indicating their respective percentages.

The three predominant phyla were: *Cyanobacteria* (41.4% of the bacterial reads), *Proteobacteria* (29%), and *Bacteroidetes* (12.2%). Notably, 16.5% of bacterial reads remained unidentified, highlighting the presence of novel sequences in this study.

The *Cyanobacteria* phylogenetically belong to oxygenic phototrophic bacteria frequently found in rivers [74,75]. Almost all *Cyanobacteria* were classified within the class *Oscillatoriophycidaeae* (94.4%), with the majority falling under the order *Chroococcales*, a dominant group in freshwater biotopes [76].

Within *Proteobacteria*, we encountered three predominant classes: *Gammaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*, exhibiting similar abundances at 34.7% and 31.5%, respectively, and *Bacteroidetes* at 13.22%. *Proteobacteria*, a prolific phylum of Gram-negative bacteria in freshwater bacterial communities [77] demonstrates rapid growth in response to organic nutrients [78]. *Gammaproteobacteria*, known for its high taxonomic diversity, featured *Alteromonadales* as the most prevalent order (31%), a representative of river microbial communities [79,80]. Notably, the order *Pseudomonadales* (8% of *Gammaproteobacteria* reads) includes the *Pseudomonadaceae* and *Moraxellaceae* families, some of whose members, such as *Pseudomonas*, play an active role in the degradation of phenolic compounds [81,82]. *Betaproteobacteria* were predominantly of the *Burkholderiales* order (74.7%), and among the *Alphaproteobacteria*, *Rhodobacterales* stood out (42.5%).

Within *Bacteroidetes*, Gram-negative anaerobic bacteria with significant involvement in the degradation of humic materials and polymers [78], we found two dominant classes: *Flavobacteria* (54% of *Bacteroidetes*) and *Sphingobacteriia* (40.5%).

Freshwater microbial communities have been suggested as excellent bioindicators for assessing the impact of micropollutants in river ecosystems [83] because disruptions at this level can have consequences throughout all trophic levels [83,84], leading to unpredictable effects on the ecological balance of the aquatic environment [85]. These communities serve as the foundation of the aquatic food web, particularly among primary producers, and also play a significant role in organic matter decomposition, thereby contributing to nutrient cycling and energy exchange, as well as the degradation of pollutants [86,87].

While our results indicate high toxicity of HQ in various aquatic indicators, it is surprising how the impact on the growth and metabolic capacity of these microbial communities appears to be buffered, as if these communities could effectively withstand HQ's toxic effects.

In Figure 3 the effect of HQ on river microbial communities, measured as AWCD, can be seen. Furthermore, Figure 4 illustrates the impact of this product on the microbial profile of the community, compared to the control.

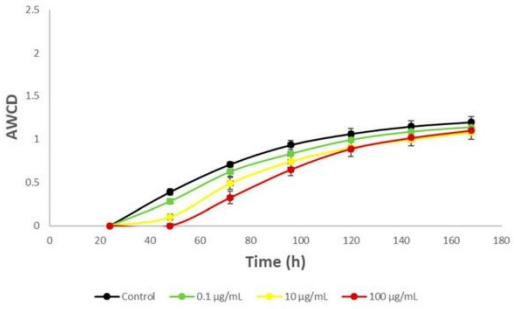


Figure 3. Average Well Color Development AWCD values of metabolized substrates in Biolog EcoPlates based on 168 h incubation of river microorganisms exposed to hydroquinone. Each point is the average value of three replicates.

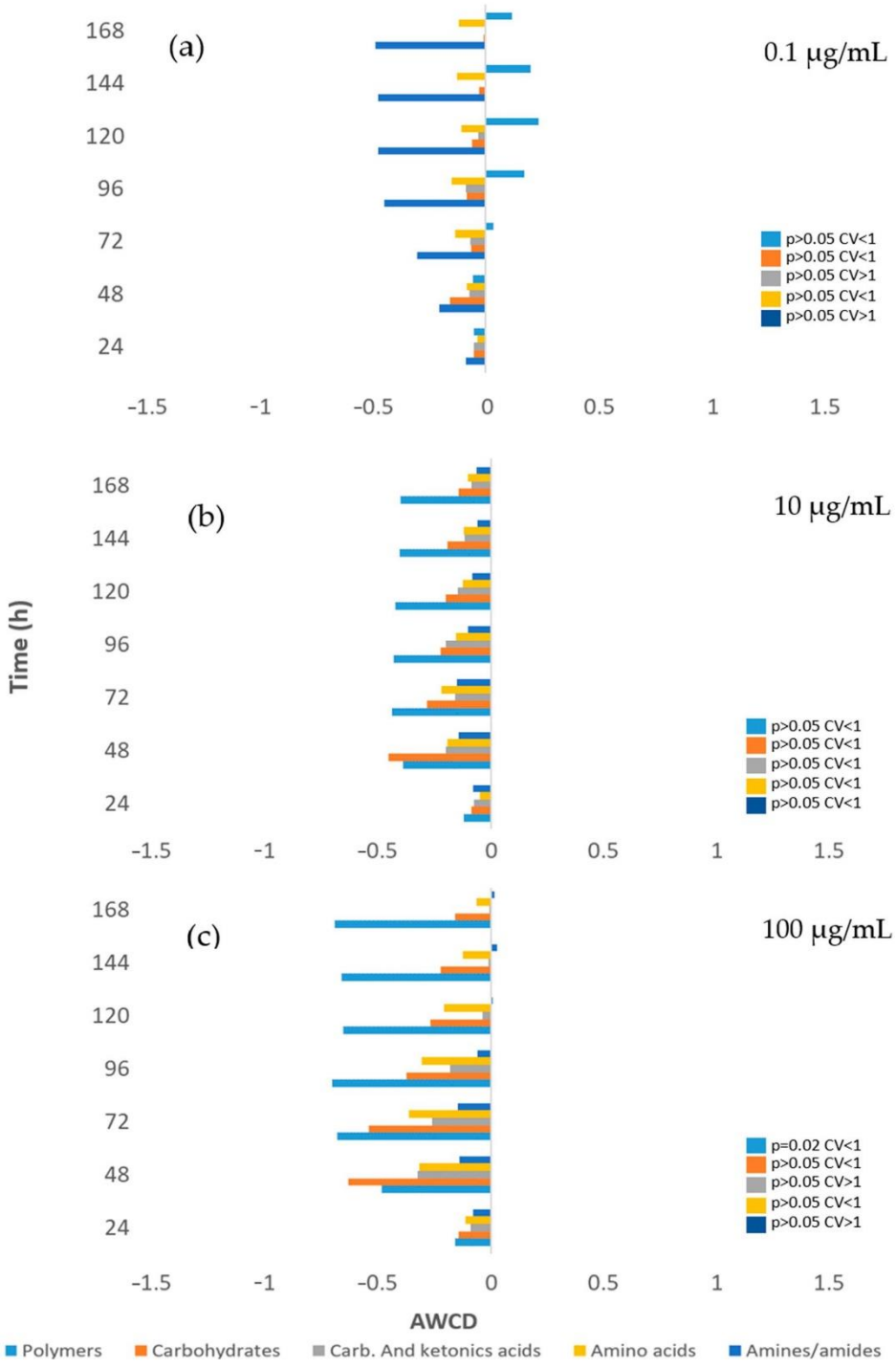


Figure 4. Metabolic effect differentiation by carbon sources of the river microorganisms exposed in different concentrations to hydroquinone with respect to the control (Y axis) ((**a**) 0.1µg/mL; (**b**) 10 µg/mL; (**c**) 100 µg/mL). Each point is the average value of three replicates (Average Well Color Development-AWCD). The significance of differences from the control is indicated by *p*-values (t—Student), and the dispersion of values among the three replicates is represented by the coefficient of variation (CV).

Furthermore, among the diversity of taxa, there may also exist varying metabolic capabilities, with certain bacteria potentially possessing mechanisms capable of degrading HQ. These microorganisms may derive greater advantages than others, potentially reshaping ecological interactions where the dominant flora that degrades HQ hydroquinone can be gradually formed [88,89]. As can be seen (Figure 3), although at the beginning there were small differences, after 72 h the growth of the community exposed to HQ practically matched those of the control, possibly due to these readjustments within the community.

Zhang et. al. [77] observed that concentrations of HQ at 100 mg/L (the highest tested in this study) in wastewater treatment plants resulted in the establishment of a stable community dominated by the same taxa we have identified in our samples (*Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, and *Bacteroidetes*). These taxa showed minimal variation in their relative abundance compared to the control [32]. Specifically, the abundance of *Cyanobacteria* remained largely unaffected, *Bacteroidetes* showed a slight increase, and *Proteobacteria* exhibited a minor decrease in this study. The limited impact on Cyanobacteria, which constitute nearly half of our samples, may explain the minimal metabolic changes observed in our study, even at the highest concentration. Proteobacteria, as the largest group of Gram-negative bacteria with a wide range of metabolic pathways and a major role in the degradation of phenolic compounds [90], could withstand the HQ impact despite experiencing a modest decline (on the order of 10% at 100 mg/L) according to Zhang et. al. In fact, several members of this group present in our samples have been reported to be able to metabolize HQ.

Among the *Gammaproteobacteria* we found *Pseudomonadales* (specifically *Pseudomonas* genera) and members of the *Moraxellaceae* family, both proficient in utilizing and degrading HQ [80,81,91,92]. Additionally, within the Betaproteobacteria, we observed the presence of *Burkholderiales*, also capable of following HQ degradation pathways [7].

On the other hand, *Bacteroidetes* are known for their capacity to degrade various complex carbon compounds, including HQ [93], potentially increasing in number to compensate for the loss of Proteobacteria.

Beyond these changes in community structure reported, our results demonstrate that the final result of this taxonomic rearrangement within the community is that the metabolic capacity of the entire community is minimally affected by HQ (Figure 4).

Only a decrease in the ability to metabolize polymers at the highest concentration of 100 µg/mL (p = 0.02) appears to occur. All other changes in the metabolic profile of the microbial community are not significant at any of the concentrations tested. This would be consistent with studies showing that functional genes for carbohydrate metabolism and energy metabolism were maintained at a high level following HQ exposure [32].

Therefore, although initially, the microbial flora was stressed by the influent HQ, which may even trigger the secretion of secondary metabolites that increase toxicity [32,33] the microbial community, after a succession of biological communities, gradually forms a dominant flora capable of degrading or tolerating HQ. As a result, the metabolic capacity of the microbial community remains stable, and it is foreseeable that the impact of HQ on rivers will be minimal.

In many countries, the implementation of maximum concentration limits for the industrial discharge of phenols has been established [5,94]. These limits typically range from low mg/L to µg/L, depending on the specific discharge location and the flow characteristics of the watercourse (EC, Commission Implementing Decision (EU), 2018) [95]. While these levels may provide protection for microbial communities, it is not necessarily guaranteed for other aquatic organisms, such as *D. magna*.

3.4. Impact of Hydroquinone on Allium cepa

HQ also exhibits phytotoxicity on *A. cepa*, significantly impacting bulb root growth. EC_{50} obtained was 7.631 (6.720–8.676) µg/mL and the dose–response curve after 72 h exposition is shown in Figure 5a.

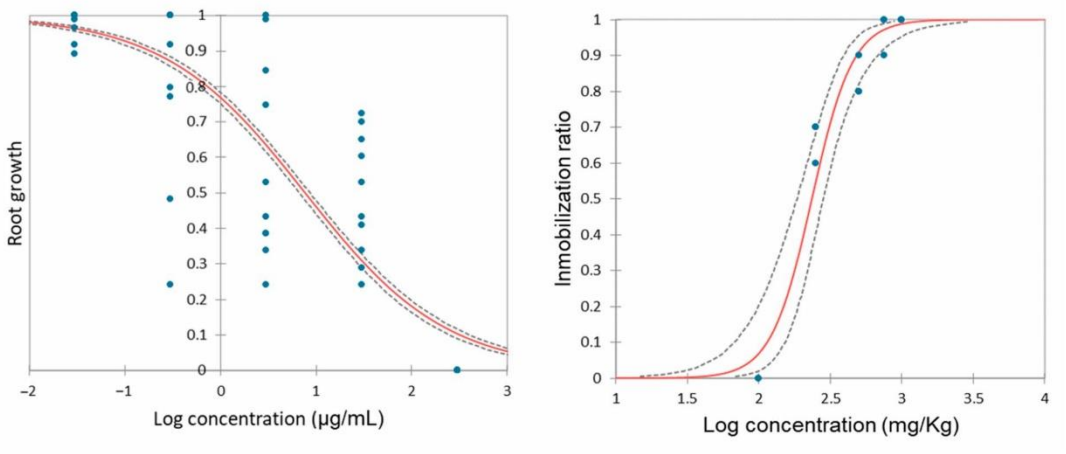


Figure 5. Dose–response curve for (**a**) *Allium cepa* and for (**b**) *Eisenia fetida* after 72 h and 14 days of exposure to hydroquinone, respectively. Red line represents the model and dashed lines indicate the confidence limits (95%). The points indicate the values of the replicates, in some cases the values may overlap.

While it has long been recognized that phenols can cause chromosomal fragmentation in *A. cepa* and disrupt root mitosis upon exposure [96], as far as our knowledge goes, the ecotoxicity of HQ on this plant has not been quantified before.

HQ demonstrates phytotoxicity on other plants as well: it reduces shoot growth in oats (*Avena sativa* L. 'Goodfield') and inhibits redroot pigweed [97], as well as impacting the growth of leaves, roots, and stems in common beans (*Phaseolus vulgaris*) [98]. Additionally, it exerts a phytotoxic effect on the germination of the plant species *Trigonella foenum-graecum* [99].

Previous reports have suggested changes in the polarization of the plant cell membrane after exposure to HQ, which could impact substance transport, although this effect appears to be minor in explaining cell death [98]. Probably, the primary mode of action of HQ involves significant damage to cellular membrane integrity, leading to a loss of metabolic activities and macromolecules, accompanied by associated oxidative stress [24]. Damaged cells may then initiate an apoptosis process [99].

3.5. Impact of Hydroquinone on Eisenia fetida

Our results demonstrate that, despite *E. fetida* being the most resilient bioindicator among the four tested, it still exhibits detectable toxicity. The dose–response of the earthworm exposed to HQ can be seen in Figure 5b with LC_{50} of 234.05 (184.13–281.18) mg/kg. When comparing the toxicity values of HQ on *E. fetida* to other phenolic compounds of plant origin (non-quinones), such as tannic acid, the latter shows much higher values (LC_{50} > 2000 µg/L) [100]. However, to the best of our knowledge, the impact of HQ on earthworms, particularly *E. fetida*, has not been previously investigated. While some evidence of toxicity can be found in the literature, it often pertains to compounds within the HQ family or chemically distinct derivatives, and it may involve different earthworm species. For instance, exposure studies involving various polyesters containing HQ, among other compounds, showed an *E. fetida* survival rate exceeding 80% after 14 days, suggesting a moderate level of toxicity to these bioindicators [101].

Interestingly, Osman [102] observed that additional earthworm species, including *L. rubellus* and *A. chlorotica*, seem to exhibit susceptibility to oxidative stress induced by quinones. This susceptibility may be attributed to their deficiency or notably low levels of DT-diaphorase, an enzyme recognized for its significant role in quinone detoxification.

The exposure of earthworms to HQ can occur through the ingestion of particles carrying the active product [103] and through percutaneous means. Earthworms possess

a highly water-absorbent and water-loss-tolerant cuticle, allowing for significant water exchange through the body wall [104]. HQ's relatively low molecular weight and slight hydrophobic nature could enable its permeability in biological membranes [105]. However, it is likely that ingestion, in this case, is what triggers the cytotoxic effects.

Earthworms play a crucial role in soil health and fertility as they decompose organic matter and mix the soil, improving its structure and enhancing its ability to retain water and nutrients, thereby allowing plants to access these nutrients. Therefore, their decline or reduction can have significant consequences for soil fertility [106].

The activity of these organisms is intimately connected to that of soil microorganisms, as earthworms have an important role in promoting microbial activity, likely by feeding on microorganisms or by selecting and stimulating specific microbial groups [107].

3.6. Impact on Soil Microbial Communities: Growth and Community-Level Physiological Profiling (CLPP)

Figure 6 shows the great diversity of soil taxa. In this case the total reads were 61,347 and 100% passed quality filtering. It was possible to identify >90% of taxa at the taxonomic level of Phylum, Class, Order and Family, 88.63% at Genus and only 24.23% at species level. Figure 6a displays the relative abundance of the main taxons within each taxonomic level of the most prevalent taxa (>2%). Figure 6b, a visual representation highlights the most prominently detected phyla.

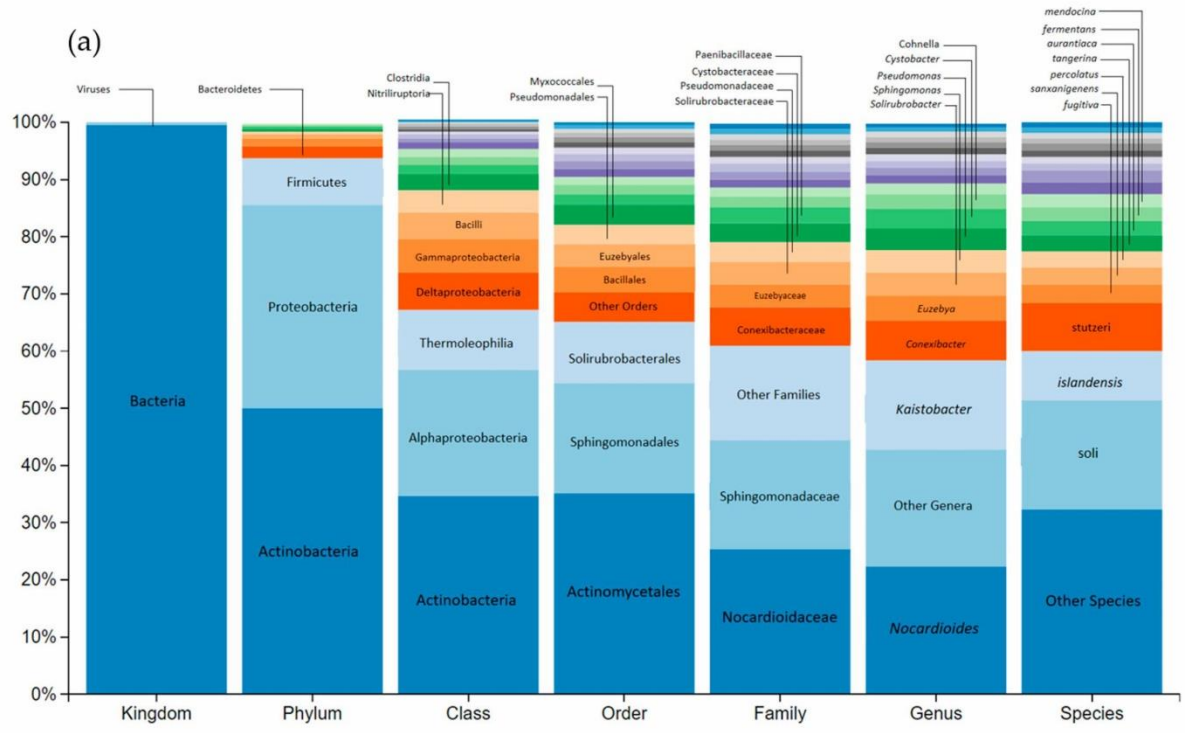


Figure 6. *Cont.*

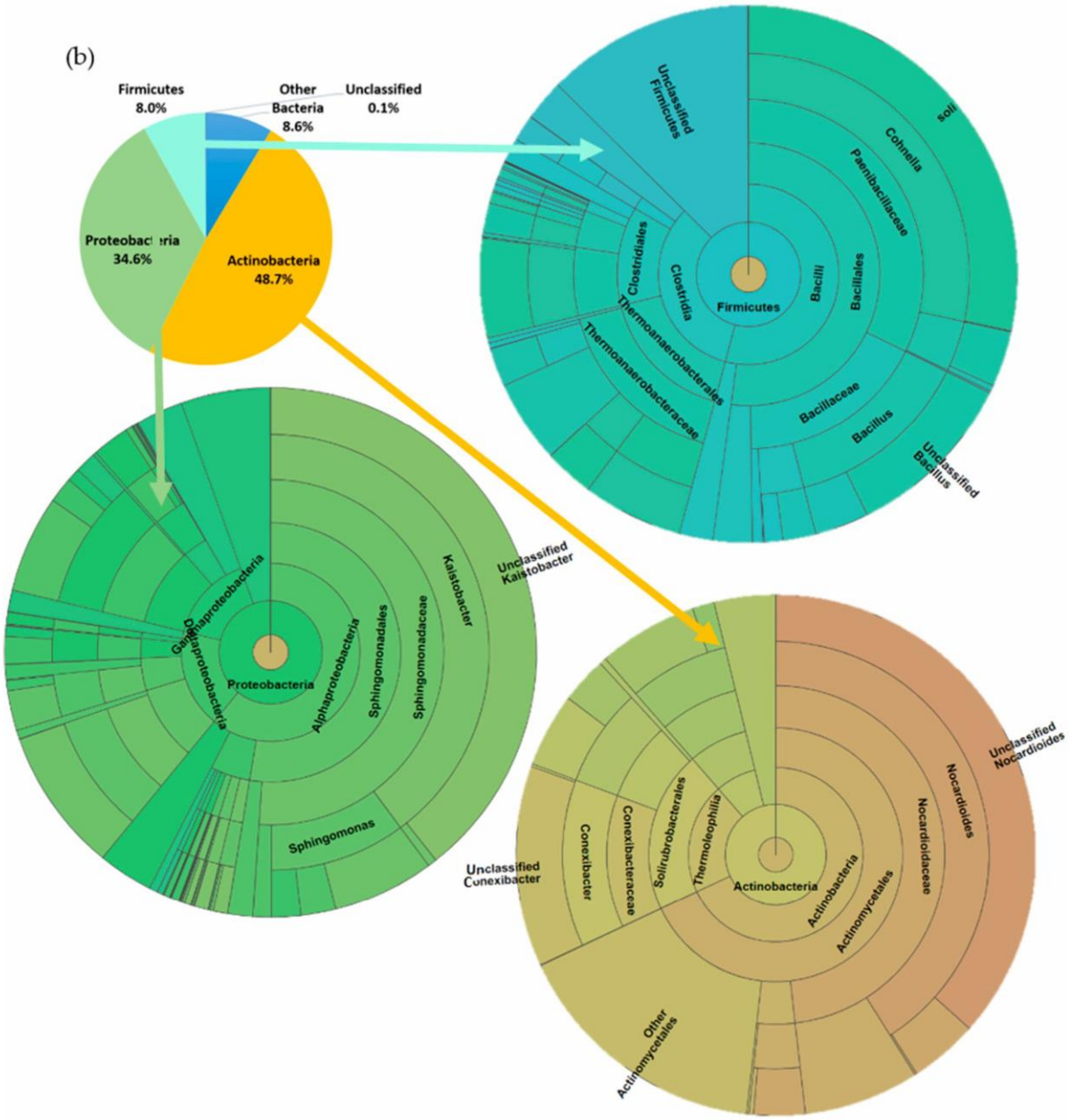


Figure 6. (**a**) Relative abundance of genetically sequenced microorganisms from a river within their taxonomic classifications at each level. (**b**) Illustration of phyla that are most prominently observed in soil. The significance of differences from the control is indicated by *p*-values (t—Student), and the dispersion of values among the three replicates is represented by the coefficient of variation (CV).

In our samples, we observed a predominance of two bacterial phyla: *Actinobacteria*, which constituted 48.7% of the bacterial reads, and *Proteobacteria*, making up 34.6% of the composition. Additionally, we detected a smaller proportion of *Firmicutes*, accounting for 8.0% of the total reads. This taxonomic distribution aligns with the typical bacterial diversity encountered in uncontaminated edaphic ecosystems where *Proteobacteria* are usually

very abundant [108,109], *Actinobacteria* phyla are well represented [82] and *Firmicutes* are frequently detected [110–112].

Among the *Actinobacteria*, the Class *Actinobacteria* predominates (68.0%), practically all belonging to the order *Actynomycetales*, ubiquitous in different soil types [110,111,113,114]. More than half of *Proteobacteria* were *Alphaproteobacteria* (60.9%) followed by *Deltaproteobacteria* (17.9%) and *Gammaproteobacteria* (15.7%). Almost all *Alphaproteobacteria* are of the order *Sphingomonadales* with a small representation of the order *Rhizobiales* (8.11% of the *Alphaproteobacteria*). Among the *Deltaproteobacteria*, *Myxococcales* predominate (52.9%), all of them belonging to the family *Cystobacteraceae* and the genus *Cystobacter.* In *Gammaproteobacteria*, all the *Pseudomonadaceae* family are *Pseudomonas*. Among the *Firmicutes*, *Bacilli* (54.1%) and *Clostridia* (33.3%) are the predominant class.

In Figure 7, the effects of HQ on community growth measured as AWCD are depicted.

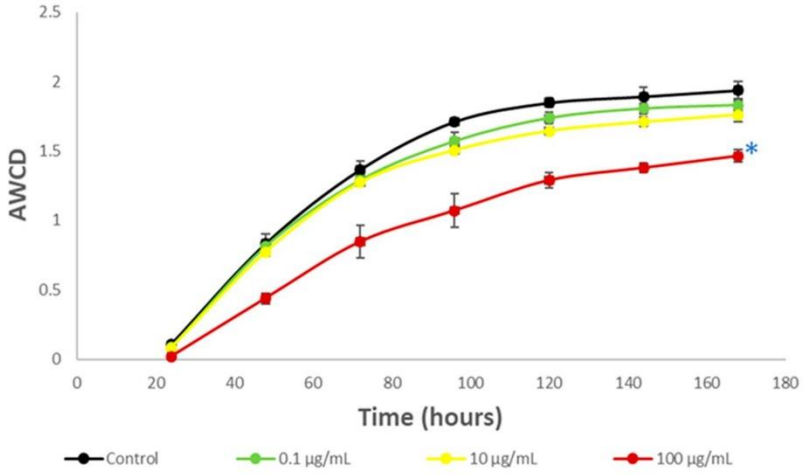


Figure 7. Average Well Color Development AWCD values of metabolized substrates in Biolog EcoPlates based on 168 h incubation of soil microorganisms exposed to hydroquinone. Each point is the average value of three replicates. Blue asterisks indicate $p = 0.05$.

As can be observed, microbial communities also appear to withstand HQ exposure well, except at concentrations greater than 100 µg/mL ($p = 0.05$). In this case, there is no initial growth decline followed by subsequent recovery, as seen in the case of river microorganisms. Instead, at 100 µg/mL, growth is partially inhibited right from the beginning of HQ exposure. This heightened sensitivity of soil microbial communities compared to aquatic ones is consistent with findings from other studies where soil or sediment microorganisms seem to be more vulnerable to potentially toxic compounds than aquatic microorganisms [115,116]. This observation has also been noted for products or extracts of plant origin [51,117].

Moreover, at the metabolic level (see Figure 8), the concentration of 100 µg/mL induces a significant decrease in the ability to metabolize not only polymers ($p = 0.012$), as observed in the case of river microbial communities, but also carbohydrates ($p = 0.006$). Nevertheless, at lower concentrations, there are no significant changes in the metabolic profile ($p > 0.05$) for any metabolite.

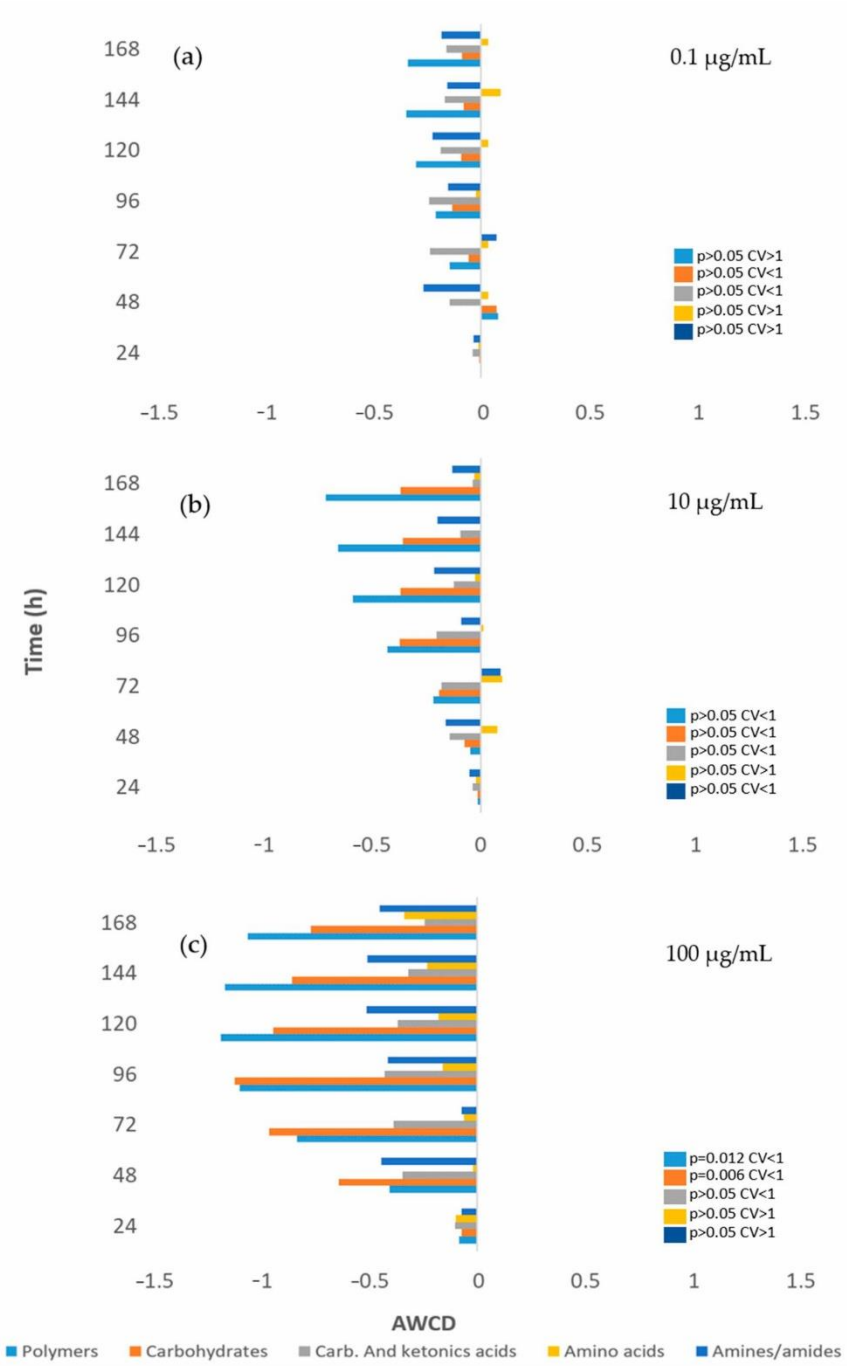


Figure 8. Metabolic effect differentiation by carbon sources of the soil microorganisms exposed in different concentrations to hydroquinone with respect to the control (O axis) ((**a**) 0.1 µg/mL; (**b**) 10 µg/mL; (**c**) 100 µg/mL). Each point is the average value of three replicates (Average Well Color Development (AWCD) in Time (h).

There are very few studies that have examined the effect of HQ on soil microbial communities. Nevertheless, there is evidence that HQ may indeed impact microbial growth.

Chen [118] observed that soils amended with HQ experience a decrease in the growth of cultivable microbial populations, with HQ being the most toxic dihydroxybenzene compared to other phenolic compounds such as resorcinol and catechol. It has also been reported that soil microorganisms' exposure can lead to minor changes, such as an increase in the relative abundance of groups involved in fermentation and cellulolysis [36], which, in some way, may account for the slight variations in the metabolic profile we have detected.

The use of HQ as a urease inhibitor [21] to prevent urease from breaking down into urea, thus increasing the availability of NH_3/NH_4^+ for plant uptake [119], has led to a limited number of studies examining the effect of HQ on soil microorganisms, especially in nitrification and denitrification processes, with varying results. On one hand, HQ, in line with our findings, appears to induce minimal changes in the community composition and functional profiles of the soil microbial community, with little impact on ureolysis groups [36,120]. However, other authors have reported that ammonia oxidation microbes were inhibited following HQ application [37] or that HQ delays urea hydrolysis, subsequently affecting nitrification and denitrification [121]. Nevertheless, there are limited reports on the effects of long-term HQ application on the soil nitrification and denitrification microbial community. Our results, however, do not indicate significant changes in the capacity to metabolize substrates potentially involved in nitrogen metabolism, such as carboxylic and ketonic acids, amino acids, or amines and amides.

The resilience exhibited by these soil microorganisms to HQ at concentrations below 100 μg/mL may stem from strategies akin to those described for aquatic microorganisms. In this scenario, we also encounter a significant diversity of taxonomic groups, making the replacement of sensitive species with more resistant ones, capable of degrading HQ, an expected occurrence. According to genetic sequencing, we have identified several genera, including *Pseudomonas* (3.31% of the total reads) and *Burkholderia* (Figure 6, within the section "other Proteobacteria") and members belonging to the order *Rhizobiales*, all of them able to metabolize HQ [80,122,123]. Furthermore, as previously discussed, taxonomic groups within the *Sphingomonadaceae* family (constituting 19.6% of total soil reads) have been found to possess mechanisms for safeguarding against HQ exposure [124].

Other mechanisms, such as the production of specific enzymes for phenolic compound detoxification, as described in *Actinomycetales* members (constituting 32.94% of total reads in our samples) [125], and the formation of biofilms, as demonstrated by *Corynebacteriaceae* within the *Actinomycetales* order (representing 32.94% of total reads), able to metabolize HQ [126], are also plausible. In fact, the microbial diversity, structure, and function of a biofilm imparts a high metabolic capacity. It has been reported that biofilms are capable of removing more than 95% of phenolic compounds, including HQ [35].

Therefore, our findings suggest that unless occurring at exceptionally high concentrations rarely encountered in the environment, the impact of HQ on soil microbial communities is likely to have minimal effects on microbial growth and will not significantly impair their metabolic capacity.

4. Conclusions

This study demonstrates that HQ, a contaminant found in river ecosystems at concentrations on the order of μg/L, exhibits high toxicity to aquatic organisms such as *D. magna* and *A. fisheri*, as well as terrestrial indicators like the plant *A. cepa* and the invertebrate *E. fetida*. However, the concentration ranges at which ecotoxicity is observed (0.142–234 μg/mL) are several orders of magnitude higher than current environmental levels. Remarkably, both riverine and soil communities appear resilient to HQ exposure, exhibiting effects on growth or metabolic profiles only at the highest tested concentrations, notably 100 μg/mL. This resilience may be attributed to the diverse array of degradative and protective taxa within these microbial communities, which mitigate HQ impact in both aquatic and terrestrial environments.

Currently, entities such as the European Parliament and the Environmental Protection Agency (EPA) have instituted discharge limits for phenolic compounds at levels ranging from 0.05 μg/mL [127] to 1 μg/mL [128] orders of magnitude lower than those causing

ecotoxicity in microbial communities but not necessarily in other aquatic organisms like *D. magna* or *A. fischeri*. It is important to consider that this exposure is persistent over extended periods and may interact with other toxins. Additionally, HQ frequently appears as an intermediate in the transformation of other compounds, potentially elevating its environmental levels. Cumulative effects, especially in soil, cannot be ruled out. Therefore, the toxicity values provided in this study should guide the maintenance and potential strengthening of discharge regulations, particularly to protect sensitive environments such as rivers and soils.

Author Contributions: Conceptualization: M.R.P.-O.; methodology: M.R.P.-O. and A.V.; software: M.R.P.-O. and A.V.; validation: M.R.P.-O. and D.B.; formal analysis: E.L.; investigation: A.V., C.G. and G.L.; resources: M.R.P.-O. and D.B.; data curation: A.V., D.B. and M.R.P.-O.; writing—original draft preparation: M.R.P.-O. and A.V.; writing—review and editing: M.R.P.-O. and E.L.; visualization: A.V.; supervision: D.B., E.L. and M.R.P.-O.; project administration: M.R.P.-O. and D.B.; funding acquisition: M.R.P.-O. and D.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento (Group T67_23R grant), Gobierno de Aragón, pre-doctoral fellowship CPB_08_21 grant; Cátedra NOVALTIA and Universidad San Jorge.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Acknowledgments: The authors would like to thank Juliana Navarro (Agri-food Research and Technology Center of Aragon, CITA, Zaragoza, Spain) for her kind contribution of soil characterization data from which microbial samples were obtained.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Appendix A

Table A1. Analysis of the river water from which the microorganism samples were obtained.

Physical-Chemical Analysis of the River Water Sample	
HCO^-_3 (mg/L)	313
TDS (mg/L)	1925
MES (mg/L)	6
Cl^- (mg/L)	618 ± 93
SO_4^{2-} (mg/L)	415 ± 62
NO_3^- (mg/L)	17.7 ± 2.7
NO_2^- (mg/L)	<0.05
F^- (mg/L)	0.071 ± 0.011
$PO4^{3-}$ (mg/L)	0.6 ± 0.09
NH_4^+(mg/L)	<0.1
O_2 (mg/L)	2.3
DQO (O_2) (mg/L)	<25
DBO5 (mg/L)	<5
Ca (mg/L)	235 ± 80
Mg (mg/L)	38.1 ± 13.7
Na (mg/L)	415 ± 95
K (mg/L)	6.08 ± 1.95

Table A2. Analysis of the soil from which the microorganism samples were collected.

Soil Composition	Surface Soil	30 cm Deep Soil
Clay content (%)	20.98	23.61
Sand content (%)	16.08	13.10
Silt content (%)	62.94	63.29
pH	7.9 ± 0.5	8.1 ± 0.5
K (mg/L)	238 ± 40	208 ± 35
Mg (mg/Kg)	244 ± 39	242 ± 39
P Oslen (mg/Kg)	13 ± 2	10 ± 1.7
$EC_{1:5}$ (dS/m)	0.6 ± 0.09	0.4 ± 0.06
Organic matter (g/100 g)	2.46 ± 0.31	2.35 ± 0.30

References

1. Braga, V.C.C.; Pianetti, G.A.; César, I.C. Comparative stability of arbutin in Arctostaphylos uva-ursi by a new comprehensive stability-indicating HPLC method. *Phytochem. Anal.* **2020**, *6*, 884–891. [CrossRef]
2. ECHA; European Chemical Agency. ECHA, Hydroquinone. Available online: https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.004.199 (accessed on 17 January 2024).
3. Matsumoto, M.; Todo, H.; Akiyama, T.; Hirata-Koizumi, M.; Sugibayashi, K.; Ikarashi, Y.; Ono, A.; Hirose, A.; Yokoyama, K. Risk assessment of skin lightening cosmetics containing hydroquinone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *16*, 128–135. [CrossRef] [PubMed]
4. Remberger, M.; Hynning, P.A.; Neilson, A.H. 2,5-dichloro-3,6-dihydroxybenzo-1,4-quinone—identification of a new organochlorine compound in kraft mill bleachery effluents. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 1903–1907. [CrossRef]
5. Neven, L.; Barich, H.; Rutten, R.; De Wael, K. Novel (photo)electrochemical analysis of aqueous industrial samples containing phenols. *Microchem. J.* **2022**, *181*, 107778. [CrossRef]
6. Choi, Y.; Jeon, J.; Kim, S.D. Identification of biotransformation products of organophosphate ester from various aquatic species by suspect and non-target screening approach. *Water Res.* **2021**, *200*, 117201. [CrossRef] [PubMed]
7. Marchlewicz, A.; Guzik, U.; Wojcieszynska, D. Over-the-Counter Monocyclic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environment-Sources, Risks, Biodegradation. *Water Air Soil. Pollut.* **2015**, *226*, 355. [CrossRef] [PubMed]
8. Zur, J.; Wojcieszynska, D.; Hupert-Kocurek, K.; Marchlewicz, A.; Guzik, U. Paracetamol—toxicity and microbial utilization. Pseudomonas moorei KB4 as a case study for exploring degradation pathway. *Chemosphere* **2018**, *206*, 192–202. [CrossRef] [PubMed]
9. Wang, W.; Yu, H.; Qin, H.; Long, Y.; Ye, J.; Qu, Y. Bisphenol A degradation pathway and associated metabolic networks in Escherichia coli harboring the gene encoding CYP450. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *388*, 121737. [CrossRef] [PubMed]
10. Bolobajev, J.; Oncu, N.B.; Viisimaa, M.; Trapido, M.; Balcioglu, I.; Goi, A. Column experiment on activation aids and biosurfactant application to the persulphate treatment of chlorophene-contaminated soil. *Environ. Technol.* **2015**, *36*, 348–357. [CrossRef]
11. Hoang Nhat Phong, V.; Le, G.K.; Thi Minh Hong, N.; Xuan-Thanh, B.; Khanh Hoang, N.; Rene, E.R.; Thi Dieu Hien, V.; Ngoc-Dan Thanh, C.; Mohan, R. Acetaminophen micropollutant: Historical and current occurrences, toxicity, removal strategies and transformation pathways in different environments. *Chemosphere* **2019**, *236*, 124391. [CrossRef]
12. Wang, Y.; Li, X.; Sun, X. The transformation mechanism and eco-toxicity evaluation of butylated hydroxyanisole in environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2022**, *231*, 113179. [CrossRef]
13. Tentscher, P.R.; Escher, B.I.; Schlichting, R.; König, M.; Bramaz, N.; Schirmer, K.; von Gunten, U. Toxic effects of substituted p-benzoquinones and hydroquinones in in vitro bioassays are altered by reactions with the cell assay medium. *Water Res.* **2021**, *202*, 117415. [CrossRef] [PubMed]
14. Di Marzio, W.D.; Saenz, M.; Alberdi, J.; Tortorelli, M.; Silvana, G. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *61*, 380–391. [CrossRef]
15. Otitoju, O.B.; O Alfred, M.; Olorunnisola, C.G.; Aderinola, F.T.; O Ogunlaja, O.; Olukanni, O.D.; Ogunlaja, A.; O Omorogie, M.; I Unuabonah, E. Distribution and toxicity of dihydroxybenzenes in drinking water sources in Nigeria. *RSC Adv.* **2024**, *14*, 982–994. [CrossRef]
16. Karami-Kolmoti, P.; Beitollahi, H.; Modiri, S. Electrochemical Sensor for Simple and Sensitive Determination of Hydroquinone in Water Samples Using Modified Glassy Carbon Electrode. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1869. [CrossRef]
17. Yang, L.; Zhao, H.; Fan, S.; Li, B.; Li, C.-P. A highly sensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of hydroquinone and bisphenol A based on the ultrafine Pd nanoparticle@TiO_2 functionalized SiC. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *852*, 28–36. [CrossRef]
18. Hernandez, S.R.; Kergaravat, S.V.; Isabel Pividori, M. Enzymatic electrochemical detection coupled to multivariate calibration for the determination of phenolic compounds in environmental samples. *Talanta* **2013**, *106*, 399–407. [CrossRef]
19. Varela, A.; Martins, C.; Nunez, O.; Martins, I.; Houbraken, J.A.M.P.; Martins, T.M.; Leitao, M.C.; McLellan, I.; Vetter, W.; Galceran, M.T.; et al. Understanding fungal functional biodiversity during the mitigation of environmentally dispersed pentachlorophenol in cork oak forest soils. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 2922–2934. [CrossRef]

20. Lin, J.; Chen, J.; Wang, Y.; Cai, X.; Wei, X.; Qiao, X. More toxic and photoresistant products from photodegradation of fenoxaprop-p-ethyl. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8226–8230. [CrossRef] [PubMed]
21. Candido, N.R.; Modolo, L.V.; Pasa, V.M.D.; de Fatima, A. Pyroligneous Acids of Coconut Shell, Black Wattle and Eucalyptus: Physical-Chemical Characterization and in vitro Evaluation as Potential Urease Inhibitors. *Quim. Nova* **2023**, *46*, 961–971. [CrossRef]
22. REACH, Authorization, and Restriction of Chemicals: 01/12/2023. Available online: http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1907/oj (accessed on 17 January 2024).
23. Baehrs, H.; Putschew, A.; Steinberg, C.E.W. Toxicity of hydroquinone to different freshwater phototrophs is influenced by time of exposure and pH. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 146–154. [CrossRef] [PubMed]
24. Pandey, D.K.; Mishra, N.; Singh, P. Relative phytotoxicity of hydroquinone on rice (*Oryza sativa* L.) and associated aquatic weed green musk chary (*Chary zeylanica* Willd.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2005**, *83*, 82–96. [CrossRef]
25. Briggs, G.G.; Henderson, I.F. Some Factors Affecting the Toxicity of Poisons to the Slug *Deroceras-reticulatum* (Muller) (Pulmonata, Limacidae). *Crop Prot.* **1987**, *6*, 341–346. [CrossRef]
26. Lahnsteiner, F. The sensitivity and reproducibility of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo test for the screening of waste water quality and for testing the toxicity of chemicals. *Atla-Altern. Lab. Anim.* **2008**, *36*, 299–311. [CrossRef] [PubMed]
27. Abugazleh, M.K.; Ali, H.M.; Chester, J.A.; Al-Fa'ouri, A.M.; Bouldin, J.L. Aquatic toxicity of hydroquinone and catechol following metal oxide treatment to *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Ecotoxicology* **2023**, *32*, 656–665. [CrossRef]
28. Pereira, P.; Enguita, F.J.; Ferreira, J.; Leitão, A.L. DNA damage induced by hydroquinone can be prevented by fungal detoxification. *Toxicol. Rep.* **2014**, *1*, 1096–1105. [CrossRef]
29. Stadnichenko, A.P.; Pogorelova, N.S.; Rudenko, S.A. The Effect of Different Concentrations of Hydroquinone on Horn Snails (*Gastropoda, Pulmonata, Bulinidae*) Infected with Parthenitae of Tylodelphys-Excavata (*Trematoda, Diplostomatidae*). *Parazitologiya* **1991**, *25*, 462–467.
30. Devillers, J.; Boule, P.; Vasseur, P.; Prevot, P.; Steiman, R.; Seiglemurandi, F.; Benoitguyod, J.L.; Nendza, M.; Grioni, C.; Dive, D.; et al. Environmental and Health Risks of Hydroquinone. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1990**, *19*, 327–354. [CrossRef]
31. Wang, X.D.; Yu, J.Z.; Wang, Y.; Wang, L.S. Mechanism-based quantitative structure-activity relationships for the inhibition of substituted phenols on germination rate of Cucumis sativus. *Chemosphere* **2002**, *46*, 241–250. [CrossRef]
32. Zhang, X.; Linghu, S.; Chen, Z.; Gu, H.; Chen, X.; Wei, X.; Hu, X.; Yang, Y.; Gao, Y. Bacterial diversity evolution process based on physicochemical characteristics of sludge treating hydroquinone during acclimation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 31686–31699. [CrossRef] [PubMed]
33. Chen, X.; Hu, X.; Lu, Q.; Yang, Y.; Linghu, S.; Zhang, X. Study on the differences in sludge toxicity and microbial community structure caused by catechol, resorcinol and hydroquinone with metagenomic analysis. *J. Environ. Manag.* **2022**, *302*, 114027. [CrossRef] [PubMed]
34. Wang, W.; Wu, B.; Pan, S.; Yang, K.; Hu, Z.; Yuan, S. Performance robustness of the UASB reactors treating saline phenolic wastewater and analysis of microbial community structure. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *331*, 21–27. [CrossRef] [PubMed]
35. Tian, H.; Xu, X.; Qu, J.; Li, H.; Hu, Y.; Huang, L.; He, W.; Li, B. Biodegradation of phenolic compounds in high saline wastewater by biofilms adhering on aerated membranes. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *392*, 122463. [CrossRef] [PubMed]
36. Li, W.; Xiao, Q.; Hu, C.; Liu, B.; Sun, R. A comparison of the efficiency of different urease inhibitors and their effects on soil prokaryotic community in a short-term incubation experiment. *Geoderma* **2019**, *354*, 113877. [CrossRef]
37. Dong, D.; Kou, Y.; Yang, W.; Chen, G.; Xu, H. Effects of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions and nitrifying/denitrifying microbial communities in a rainfed maize soil: A 6-year field observation. *Soil. Tillage Res.* **2018**, *180*, 82–90. [CrossRef]
38. Weaver, J.H.; Frederikse, H.P.R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1977.
39. ECD; SIDS. *"Hydroquinone," CAS 123-31-9*; UNEP Publications: Helsinki, Finland, 2012.
40. Suresh, S.; Srivastava, V.C.; Mishra, I.M. Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: A review. *Int. J. Energy Environ. Eng.* **2012**, *3*, 32. [CrossRef]
41. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*; OECD: Paris, France, 2004.
42. *UNE-EN ISO 6341*; Water Quality—Determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna Straus (*Cladocera Crustacea*)—Acute Toxicity Test. AENOR: Madrid, Spain, 2012.
43. *ISO 11348*; Water Quality—Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of Aliivibrio fischeri (Luminescent Bacteria Test). International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
44. Fiskesjö, G. The allium test in wastewater monitoring. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **1993**, *8*, 291–298. [CrossRef]
45. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*; OECD: Paris, France, 1984.
46. Pino, M.R.; Val, J.; Mainar, A.M.; Zuriaga, E.; Español, C.; Langa, E. Acute toxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. *Sci. Total Environ.* **2015**, *518–519*, 225–237. [CrossRef]
47. *ISO 19458:2006*; Water Quality—Sampling for Microbiological Analysis. AENOR: Madrid, Spain, 2007.
48. Pino-Otín, M.R.; Muñiz, S.; Val, J.; Navarro, E. Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. *Sci. Total Environ.* **2017**, *595*, 441–450. [CrossRef] [PubMed]

49. Pohland, B.; Owen, B. TAS technical bulletin. *Biolog* **2009**, *1*, 1–3.
50. Garland, J.L.; Mills, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2351–2359. [CrossRef]
51. Pino-Otin, M.R.; Langa, E.; Val, J.; Mainar, A.M.; Ballestero, D. Impact of citronellol on river and soil environments using non-target model organisms and natural populations. *J. Environ. Manag.* **2021**, *287*, 112303. [CrossRef]
52. Pino-Otín, M.R.; Ballestero, D.; Navarro, E.; González-Coloma, A.; Val, J.; Mainar, A.M. Ecotoxicity of a novel biopesticide from *Artemisia absinthium* on non-target aquatic organisms. *Chemosphere* **2019**, *216*, 131–146. [CrossRef] [PubMed]
53. Lu, N.; Lu, Y.; Liu, F.; Zhao, K.; Yuan, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Qin, H.; Zhu, J. $H_3PW_{12}O_{40}/TiO_2$ catalyst-induced photodegradation of bisphenol A (BPA): Kinetics, toxicity and degradation pathways. *Chemosphere* **2013**, *91*, 1266–1272. [CrossRef] [PubMed]
54. Tissot, A.; Boule, P.; Lemaire, J.; Lambert, S.; Palla, J.C. Photochemistry and Environment 10: Evaluation of the Toxicity of Phototransformation Products of Hydroquinone and Chlorophenols in Aqueous-Media. *Chemosphere* **1985**, *14*, 1221–1230. [CrossRef]
55. Crisinel, A.; Delaunay, L.; Rossel, D.; Tarradellas, J.; Meyer, H.; Saiah, H.; Vogel, P.; Delisle, C.; Blaise, C. Cyst-Based Ecotoxicological Tests Using Anostracans—Comparison of 2 Species of *Streptocephalus*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **1994**, *9*, 317–326. [CrossRef]
56. Kuznetsova, T.V.; Sladkova, G.V.; Kholodkevich, S.V. Evaluation of functional state of crayfish *Pontastacus leptodactylus* in normal and toxic environment by characteristics of their cardiac activity and hemolymph biochemical parameters. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **2010**, *46*, 241–250. [CrossRef]
57. Prosser, L. Temperature. In *Sravnitel 'naya fiziologiya zhivotnykh (Comparative Animal Physiology)*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 1977; Volume 2, pp. 84–209. ISBN 978-0-471-85767-9.
58. IPCS. Hydroquinone. *Environ. Health Criteria* **1994**, *157*. Available online: https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc157.htm (accessed on 17 January 2024).
59. Sladkova, S.V.; Kholodkevich, S.V. Total protein in hemolymph of crawfish *Pontastacus leptodactylus* as a parameter of the functional state of animals and a biomarker of quality of habitat. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **2011**, *47*, 160–167. [CrossRef]
60. Mondrala, S.; Eastmond, D.A. Topoisomerase II inhibition by the bioactivated benzene metabolite hydroquinone involves multiple mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *184*, 259–268. [CrossRef]
61. El Najjar, N.H.; Touffet, A.; Deborde, M.; Journel, R.; Leitner, N.K.V. Kinetics of paracetamol oxidation by ozone and hydroxyl radicals, formation of transformation products and toxicity. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *136*, 137–143. [CrossRef]
62. Muneer, M.; Singh, H.K.; Bahnemann, D. Semiconductor-mediated photocatalysed degradation of two selected priority organic pollutants, benzidine and 1,2-diphenylhydrazine, in aqueous suspension. *Chemosphere* **2002**, *49*, 193–203. [CrossRef] [PubMed]
63. Turkay, O.; Barisci, S.; Ozturk, H.; Ozturk, B.; Seker, M.G. Toxicological Profile of 1,4-Benzoquinone and Its Degradation Byproducts during Electro-Fenton, Electrocoagulation, and Electrosynthesized Fe(VI) Oxidation. *J. Environ. Eng.* **2018**, *144*, 04018124. [CrossRef]
64. Guo, Q.; Zhou, Y.; Pang, S.-Y.; Gao, Y.; Duan, J.; Li, J.; Jiang, J. Transformation and detoxification of sulfamethoxazole by permanganate (Mn(VII)) in the presence of phenolic humic constituents. *Chem. Eng. J.* **2021**, *413*, 127534. [CrossRef]
65. El-Ghenymy, A.; Maria Rodriguez, R.; Brillas, E.; Oturan, N.; Oturan, M.A. Electro-Fenton degradation of the antibiotic sulfanilamide with Pt/carbon-felt and BDD/carbon-felt cells. Kinetics, reaction intermediates, and toxicity assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21*, 8368–8378. [CrossRef] [PubMed]
66. Rosal, R.; Gonzalo, M.S.; Boltes, K.; Leton, P.; Vaquero, J.J.; Garcia-Calvo, E. Identification of intermediates and assessment of ecotoxicity in the oxidation products generated during the ozonation of clofibric acid. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *172*, 1061–1068. [CrossRef] [PubMed]
67. Calza, R.; Massolino, C.; Pelizzetti, E. Photo-induced transformation of hexaconazole and dimethomorph over TiO_2 suspension. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **2008**, *200*, 356–363. [CrossRef]
68. Santos, A.; Yustos, P.; Quintanilla, A.; Garcia-Ochoa, F.; Casas, J.A.; Rodriguez, J.J. Evolution of toxicity upon wet catalytic oxidation of phenol. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 133–138. [CrossRef] [PubMed]
69. Jeyanthi, V.; Anbu, P.; Vairamani, M.; Velusamy, P. Isolation of hydroquinone (benzene-1,4-diol) metabolite from halotolerant *Bacillus methylotrophicus* MHC10 and its inhibitory activity towards bacterial pathogens. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 429–439. [CrossRef]
70. Jurica, K.; Gobin, I.; Kremer, D.; Cepo, D.V.; Grubesic, R.J.; Karaconji, I.B.; Kosalec, I. Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J. Herb. Med.* **2017**, *8*, 17–23. [CrossRef]
71. Bikowska, B.Z.; Franiczek, R.; Sowa, A.; Polukord, G.; Krzyzanowska, B.; Sroka, Z. Antimicrobial and Antiradical Activity of Extracts Obtained from Leaves of Five Species of the Genus *Bergenia*: Identification of Antimicrobial Compounds. *Microb. Drug Resist.* **2017**, *23*, 771–780. [CrossRef] [PubMed]
72. Sathiyamoorthi, E.; Faleye, O.S.; Lee, J.-H.; Lee, J. Hydroquinone derivatives attenuate biofilm formation and virulence factor production in *Vibrio* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **2023**, *384*, 127534. [CrossRef] [PubMed]
73. Mol, V.P.L.; Abdulaziz, A.; Sneha, K.G.; Praveen, P.J.; Raveendran, T.V.; Parameswaran, P.S. Inhibition of pathogenic *Vibrio harveyi* using calamenene, derived from the Indian gorgonian *Subergorgia reticulata*, and its synthetic analog. *3 Biotech* **2020**, *10*, 248. [CrossRef]
74. Genuario, D.B.; Vaz, M.; de Vielo, I.S. Phylogenetic insights into the diversity of homocytous cyanobacteria from Amazonian rivers. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2017**, *116*, 120–135. [CrossRef] [PubMed]
75. Sun, F.L.; Wang, Y.S.; Wu, M.L.; Sun, C.C. Cyanobacterial community diversity in the sediments of the Pearl River Estuary in China. *Sci. Mar.* **2017**, *81*, 477–485. [CrossRef]

76. McGregor, G.B.; Fabbro, L.D.; Lobegeiger, J.S. Freshwater planktic Chroococcales (Cyanoprokaryota) from North-Eastern Australia: A morphological evaluation. *Nova Hedwig.* **2007**, *84*, 299–331. [CrossRef]
77. Battistuzzi, F.U.; Hedges, S.B. A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 335–343. [CrossRef]
78. Madigan, T.M.; Martinko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, D.H.; Stahl, D.A.; Aiyer, J.; Martinko, J.M. *Brock Biology of Microorganisms, Global Edition*, 14th ed.; Pearson Education: Madrid, Spain, 2015.
79. Xia, N.; Xia, X.H.; Zhu, B.T.; Zheng, S.K.; Zhuang, J. Bacterial diversity and community structure in the sediment of the middle and lower reaches of the Yellow River, the largest turbid river in the world. *Aquat. Microb. Ecol.* **2013**, *71*, 43–55. [CrossRef]
80. Narciso-da-Rocha, C.; Manaia, C.M. Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. *Sci. Total Environ.* **2016**, *563*, 1–9. [CrossRef]
81. Zhang, S.; Sun, W.; Xu, L.; Zheng, X.; Chu, X.; Tian, J.; Wu, N.; Fan, Y. Identification of the *para*-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in *pseudomonas* sp. 1-7. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 27. [CrossRef]
82. Spain, J.C.; Gibson, D.T. Pathway for Biodegradation of Para-Nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 812–819. [CrossRef]
83. Liu, S.; Wang, P.; Wang, C.; Chen, J.; Wang, X.; Hu, B.; Yuan, Q. Ecological insights into the disturbances in bacterioplankton communities due to emerging organic pollutants from different anthropogenic activities along an urban river. *Sci. Total Environ.* **2021**, *796*, 148973. [CrossRef]
84. Zhang, M.; Sun, Q.; Chen, P.; Wei, X.; Wang, B. How microorganisms tell the truth of potentially toxic elements pollution in environment. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *431*, 128456. [CrossRef]
85. Wang, W.; Weng, Y.; Luo, T.; Wang, Q.; Yang, G.; Jin, Y. Antimicrobial and the Resistances in the Environment: Ecological and Health Risks, Influencing Factors, and Mitigation Strategies. *Toxics* **2023**, *11*, 185. [CrossRef]
86. Schoffelen, N.J.; Mohr, W.; Ferdelman, T.G.; Duerschlag, J.; Littmann, S.; Ploug, H.; Kuypers, M.M.M. Phosphate availability affects fixed nitrogen transfer from diazotrophs to their epibionts. *ISME J.* **2019**, *13*, 2701–2713. [CrossRef]
87. Wang, Z.; Han, S.; Cai, M.; Du, P.; Zhang, Z.; Li, X. Environmental behavior of methamphetamine and ketamine in aquatic ecosystem: Degradation, bioaccumulation, distribution, and associated shift in toxicity and bacterial community. *Water Res.* **2020**, *174*, 115585. [CrossRef]
88. Zhang, C.; Li, J.; Cheng, F.; Liu, Y. Enhanced phenol removal in an innovative lignite activated coke-assisted biological process. *Bioresour. Technol.* **2018**, *260*, 357–363. [CrossRef] [PubMed]
89. Zhao, J.; Chen, X.; Bao, L.; Bao, Z.; He, Y.; Zhang, Y.; Li, J. Correlation between microbial diversity and toxicity of sludge treating synthetic wastewater containing 4-chlorophenol in sequencing batch reactors. *Chemosphere* **2016**, *153*, 138–145. [CrossRef] [PubMed]
90. Ansola, G.; Arroyo, P.; Saenz de Miera, L.E. Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* **2014**, *473*, 63–71. [CrossRef] [PubMed]
91. Rios-Miguel, A.B.; Smith, G.J.; Cremers, G.; van Alen, T.; Jetten, M.S.M.; Camp, H.J.M.O.d.; Welte, C.U. Microbial paracetamol degradation involves a high diversity of novel amidase enzyme candidates. *Water Res. X* **2022**, *16*, 100152. [CrossRef] [PubMed]
92. Park, S.; Oh, S. Activated sludge-degrading analgesic drug acetaminophen: Acclimation, microbial community dynamics, degradation characteristics, and bioaugmentation potential. *Water Res.* **2020**, *182*, 115957. [CrossRef] [PubMed]
93. Traversi, D.; Villa, S.; Lorenzi, E.; Degan, R.; Gilli, G. Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *J. Environ. Manag.* **2012**, *111*, 173–177. [CrossRef] [PubMed]
94. Villegas, L.G.C.; Mashhadi, N.; Chen, M.; Mukherjee, D.; Taylor, K.E.; Biswas, N. A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. *Curr. Pollut. Rep.* **2016**, *2*, 157–167. [CrossRef]
95. Commission Implementing Decision (EU). 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 (notified under document C(2018) 3362). Official Journal of the European Union. L 141/9. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32018D0840 (accessed on 17 January 2024).
96. Westman, C.A. *The Effect Hydroquinone on Mitosis in Allium cepa*; Fordham University: New York, NY, USA, 1949.
97. Shettel, N.L.; Balke, N.E. Plant-Growth Response to Several Allelopathic Chemicals. *Weed Sci.* **1983**, *31*, 293–298. [CrossRef]
98. Keller, C.P.; Barkosky, R.R.; Seil, J.E.; Mazurek, S.A.; Grundstad, M.L. The electrical response of Phaseolus vulgaris roots to abrupt exposure to hydroquinone. *Plant Signal. Behav.* **2008**, *3*, 633–640. [CrossRef] [PubMed]
99. Bouknana, D.; Jodeh, S.; Sbaa, M.; Hammouti, B.; Arabi, M.; Darmous, A.; Slamini, M.; Haboubi, K. A phytotoxic impact of phenolic compounds in olive oil mill wastewater on fenugreek "Trigonella foenum-graecum". *Environ. Monit. Assess.* **2019**, *191*, 405. [CrossRef] [PubMed]
100. Pino-Otín, M.R.; Lorca, G.; Val, J.; Ferrando, N.; Ballestero, D.; Langa, E. Ecotoxicological Study of Tannic Acid on Soil and Water Non-Target Indicators and Its Impact on Fluvial and Edaphic Communities. *Plants* **2023**, *12*, 4041. [CrossRef]
101. Wang, H.; Cheng, Z.; Djouonkep, L.D.W.; Wang, L.; Cai, S.; Gauthier, M. Synthesis and properties of biodegradable aliphatic-aromatic polyesters derived from 4-hydroxybenzaldehyde. *J. Appl. Polym. Sci.* **2023**, *140*, e54063. [CrossRef]
102. Osman, A.M.; Den Besten, P.J.; van Noort, P.C.M. Menadione enhances oxyradical formation in earthworm extracts: Vulnerability of earthworms to quinone toxicity. *Aquat. Toxicol.* **2003**, *65*, 101–109. [CrossRef]
103. Suthar, S.; Singh, S.; Dhawan, S. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category? *Ecol. Eng.* **2008**, *32*, 99–107. [CrossRef]

104. Saxena, P.N.; Gupta, S.K.; Murthy, R.C. Comparative toxicity of carbaryl, carbofuran, cypermethrin and fenvalerate in *Metaphire posthuman* and *Eisenia fetida*—A possible mechanism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *100*, 218–225. [CrossRef]
105. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Waomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [CrossRef]
106. Ahmed, N.; Al-Mutairi, K.A. Earthworms Effect on Microbial Population and Soil Fertility as Well as Their Interaction with Agriculture Practices. *Sustainability* **2022**, *14*, 7803. [CrossRef]
107. Medina-Sauza, R.M.; Álvarez-Jiménez, M.; Delhal, A.; Reverchon, F.; Blouin, M.; Guerrero-Analco, J.A.; Cerdán, C.R.; Guevara, R.; Villain, L.; Barois, I. Earthworms Building Up Soil Microbiota, a Review. *Front. Environ. Sci.* **2019**, *7*, 81. [CrossRef]
108. Janssen, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1719–1728. [CrossRef]
109. Spain, A.M.; Krumholz, L.R.; Elshahed, M.S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *Isme J.* **2009**, *3*, 992–1000. [CrossRef] [PubMed]
110. Zhang, L.; Xu, Z.H. Assessing bacterial diversity in soil. *J. Soils Sediments* **2008**, *8*, 379–388. [CrossRef]
111. Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 6793. [CrossRef]
112. Wang, Y.J.; Liu, L.; Yang, J.F.; Duan, Y.M.; Luo, Y.; Taherzadeh, M.J.; Li, Y.F.; Li, H.K.; Awasthi, M.K.; Zhao, Z.Y. The diversity of microbial community and function varied in response to different agricultural residues composting. *Sci. Total Environ.* **2020**, *715*, 136983. [CrossRef] [PubMed]
113. Zhang, S.Y.; Fan, C.; Wang, Y.X.; Xia, Y.S.; Xiao, W.; Cui, X.L. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. *Can. J. Microbiol.* **2018**, *64*, 968–978. [CrossRef] [PubMed]
114. Blain, N.P.; Helgason, B.L.; Germida, J.J. Endophytic root bacteria associated with the natural vegetation growing at the hydrocarbon-contaminated Bitumount Provincial Historic site. *Can. J. Microbiol.* **2017**, *63*, 502–515. [CrossRef]
115. Zhang, W.; Chen, L.; Zhang, R.; Lin, K. High throughput sequencing analysis of the joint effects of BDE209-Pb on soil bacterial community structure. *J. Hazard. Mater.* **2016**, *301*, 1–7. [CrossRef]
116. Feng, G.; Xie, T.; Wang, X.; Bai, J.; Tang, L.; Zhao, H.; Wei, W.; Wang, M.; Zhao, Y. Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 11. [CrossRef]
117. Pino-Otin, M.R.; Gan, C.; Terrado, E.; Sanz, M.A.; Ballestero, D.; Langa, E. Antibiotic properties of *Satureja montana* L. hydrolate in bacteria and fungus of clinical interest and its impact in non-target environmental microorganisms. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 18460. [CrossRef]
118. Chen, H.; Yao, J.; Wang, F.; Choi, M.M.F.; Bramanti, E.; Zaray, G. Study on the toxic effects of diphenol compounds on soil microbial activity by a combination of methods. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *167*, 846–851. [CrossRef]
119. Chien, S.H.; Prochnow, L.I.; Cantarella, H. Chapter 8 Recent Developments of Fertilizer Production and Use to Improve Nutrient Efficiency and Minimize Environmental Impacts. In *Advances in Agronomy*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2009; Volume 102, pp. 267–322.
120. Bremner, J.M.; Chai, H.S. Effects of Phosphoroamides on Ammonia Volatilization and Nitrite Accumulation in Soils Treated with Urea. *Biol. Fertil. Soils* **1989**, *8*, 227–230. [CrossRef]
121. Zaman, M.; Nguyen, M.L.; Blennerhassett, J.D.; Quin, B.F. Reducing NH_3, N_2O and NO_3^-N losses from a pasture soil with urease or nitrification inhibitors and elemental S-amended nitrogenous fertilizers. *Biol. Fertil. Soils* **2008**, *44*, 693–705. [CrossRef]
122. Luisa Castrejon-Godinez, M.; Tovar-Sanchez, E.; Ortiz-Hernandez, M.L.; Encarnacion-Guevara, S.; Gabriel Martinez-Batallar, A.; Hernandez-Ortiz, M.; Sanchez-Salinas, E.; Rodriguez, A.; Mussali-Galante, P. Proteomic analysis of *Burkholderia zhejiangensis* CEIB S4-3 during the methyl parathion degradation process. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2022**, *187*, 105197. [CrossRef]
123. Jia, Y.H. Diversity of utilizing substrates of strain *Dyella* sp. la-4 and its application in soi remediation. 2009; Dissertation/Thesis. PQDT:67377505.
124. Flood, J.J.; Copley, S.D. Genome-Wide Analysis of Transcriptional Changes and Genes That Contribute to Fitness during Degradation of the Anthropogenic Pollutant Pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum*. *Msystems* **2018**, *3*, e00275–e00318. [CrossRef] [PubMed]
125. Jain, R.K.; Dreisbach, J.H.; Spain, J.C. Biodegradation of P-Nitrophenol via 1,2,4-Benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 3030–3032. [CrossRef]
126. Cejková, A.; Masák, J.; Jirku, V.; Vesely, M.; Pátek, M.; Nesvera, J. Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *21*, 317–321. [CrossRef]
127. EC. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 Amending Directives 2000/60/EC as regards priority substances in the field of water policy. 16 December 2008 L 348, 24.12.2008. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008L0105-20130913 (accessed on 17 January 2024).
128. EC. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. 12 August 2013L 226 1 24.8.2013. Available online: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:en:PDF (accessed on 17 January 2024).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo 3.2

Propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua y suelo empleadas

Tipo de ecosistema	Parámetro analizado	Resultado	
Acuático	Temperatura del agua (ºC)	17	
	pH	7.5	
	Conductividad eléctrica (mS)	2.8	
		Suelo superficial	**Suelo 30 cm de profundidad**
Terrestre	Contenido de arcilla (%)	20.98	23.61
	Contenido de arena (%)	16.08	13.10
	Contenido de limo (%)	62.94	63.29
	pH	7.9±0.5	8.1±0.5
	K (mg/L)	238±40	208±35
	Mg (mg/Kg)	244±39	242±39
	P Oslen (mg/Kg)	13±2	10±1.7
	$EC_{1:5}$ (dS/m)	0.6±0.09	0.4±0.06
	Materia orgánica (g/100g)	2.46±0.31	2.35±0.30

Anexos BLOQUE V

Anexo 5.1

Synergistic Antimicrobial Combinations of Terpineol and Antibiotics: a safe alternative for the freshwater environment?

Antonio Valenzuela, Diego Ballestero, Cristina Gan, Guillermo Lorca, Elisa Langa and María Rosa Pino-Otín *

Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, 50830 Zaragoza, Spain; * Correspondence: rpino@usj.es

Highlights

1. Terpineol-antibiotic combinations show equal or lower toxicity than antibiotic in river microbial communities
2. Terpineol- chloramphenicol combination is the most toxic to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*
3. Terpineol-florfenicol combination is the most toxic to river microbial communities
4. River microbes show lower toxicity to terpineol-antibiotic combinations than individual non-targets organisms.
5. SACTAs offer effective alternatives to antibiotics reducing resistance risk and ecotoxicity.

Abstract:

The extensive use of antibiotics has caused toxicity in aquatic ecosystems and accelerated resistance gene spread, prompting safer alternatives. This study evaluates the ecotoxicity of five Synergistic Antimicrobial Combinations of Terpineol and antibiotics (SACTAs), which enable reduced antibiotic (ABX) concentrations while maintaining efficacy. The tested combinations included gentamicin (GTM), chloramphenicol (CHL), tetracycline (TC), and florfenicol (FF) on two non-target aquatic species (*Aliivibrio fischeri* and *Daphnia magna*) and the growth and metabolic profile of river-derived microbial communities sequenced through 16S rRNA using Biolog EcoPlates™.

Terpineol (TER) exhibited LC_{50} values above typical environmental concentrations (21.49 µg/mL for *D. magna* and 17.64 µg/mL for *A. fischeri*). SACTAs displayed a complex toxicity pattern, including synergistic, additive, and antagonistic effects. CHL-containing SACTAs were the most toxic (LC_{50}: 7.84 µg/mL for *D. magna*, 12.75 µg/mL for *A. fischeri*), while FF and GTM, containing lower doses of TER combinations, were the least toxic, with LC_{50} values exceeding 30 µg/mL for *D. magna* and 60 µg/mL for *A. fischeri*. Despite higher toxicity of SACTAs compared to antibiotics alone, concentrations generally remained below MICs in single-species tests.

In contrast, river communities with high structural and functional diversity showed greater resistance to SACTA toxicity, resulting in only additive or antagonistic effects. Remarkably, all SACTAs were equally or less toxic than ABX MICs, based on growth and metabolic profile changes. FF combinations exhibited the highest toxicity, with significant metabolic alterations, including reduced carbohydrate and polymer metabolism.

These findings highlight the potential of SACTAs to reduce ABX concentrations without increasing ecotoxicity.

1. Introduction:

The widespread use of antibiotics (ABXs) has significantly increased in recent decades (Klein et al., 2021), leading to substantial amounts of these drugs and their metabolites entering water bodies (Li et al., 2018a). This contamination poses toxicity risks (Jurado et al., 2019; Sikder et al., 2024) and promotes the emergence and spread of resistance genes (Singh et al., 2019). This makes it a priority to seek alternatives that can replace or at least reduce ABXs consumption, allowing for effective bacterial infection control while minimizing environmental impact.

The combination of natural compounds, like monoterpenes, with current ABXs presents a valuable strategy to lower the minimum inhibitory concentration (MIC) of these ABXs. In a previous study, we demonstrated that Synergistic Antimicrobial Combinations of Terpineol (TER) and ABXs, (SACTAs) were capable of maintaining the antimicrobial efficacy of the ABX while reducing its MIC (Valenzuela et al., 2024, submitted). However, to our knowledge, the environmental effects of these o similar combinations have never been tested.

Terpineols ($C_{10}H_{18}O$) are monocyclic monoterpene tertiary alcohols derived mainly from various plant sources, including oils, herbs, leaves, fruits, and flowers. They are key components of essential oils from plants such as *Pinus pinaster*, *Origanum majorana*, *Salvia sclarea*, *Thymus caespititius*, and *Narcissus poeticus* (Sales et al., 2020). In the pharmaceutical industry, TER has multiple pharmacological applications (Pharmacompass, 2024), but has drawn particular attention for its antimicrobial properties, notably its antifungal activity (Zhou et al., 2014) , and especially its bactericidal effect when used alone or as part of a plant extract (Huang et al., 2021b; Sharifi-Rad et al., 2017; Wiart et al., 2023).

TER has demonstrated the ability to reduce the dosage of ABXs needed to inhibit bacterial like vancomycin against *Clostridioides difficile* (Tosun et al., 2022) and cefixime against *Klebsiella pneumoniae* (Khleifat et al., 2019). These properties make TER a strong candidate for inclusion in SACTAs. We identified five highly effective SACTAs with TER and an aminoglycoside ABX (gentamicin, GTM), one tetracycline (TC), and two amphenicols (chloramphenicol, CHL, and florfenicol, FF) (Valenzuela et al., 2024, submitted). These four antibiotics, widely used in pharmaceutical and veterinary applications, are frequently detected in water bodies due to their discharge via wastewater and sewage. Similarly, the growing industrial production and consumption of TER have contributed to its release into the environment through various waste streams, making it increasingly detectable.

This terpene's rising use extends beyond pharmacological applications to industrial and commercial purposes, particularly as a fragrance in cosmetics, soaps, and air fresheners, with global production exceeding 1,000 tons (Belsito et al., 2008). In food, its flavoring market was valued at US$28.2 billion in 2017 and is projected to grow to US$36 billion by 2022 (IAL Consultants, 2018). Additionally, TER is used in biological pest control as an insect attractant (Mitchell et al., 2018). Studies have shown that TER is present in samples from 17 different wastewater treatment plants, with concentrations in the influent ranging from $6.37 \cdot 10^{-2}$ µg/L in the U.S. to $5.63 \cdot 10^{-2}$ µg/L in Europe. TER has been identified in citrus oil processing wastewater (Ericson et al., 1992) in the industrial cryoconcentration of grapes (*Vitis vinifera*) (Albergamo et al., 2020), as a common by-product in essential oil distillation processes (Lei et al., 2016; Lund and Bryan, 1976) and in the wastewater of softwood bleached kraft pulp mills (Dal, 2021) and petrochemical facilities (Huangfu et al., 2018). Despite the efficiency of some treatment processes, TER remains detectable in the effluent, with concentrations varying from $2.5 \cdot 10^{-5}$ to $7.61 \cdot 10^{-3}$ µg/mL and $1.45 \cdot 10^{-3}$ to $1.2 \cdot 10^{-4}$ µg/mL (Simonich et al., 2000). This persistence ultimately leads to its presence in surface waters, where alpha-terpineol has been identified as a micro-pollutant in Europe (Skrbic et al., 2018) and quantitatively detected in German rivers like the River Neckar, at concentrations of $8.5 \cdot 10^{-5}$ µg/L (Jüttner, 1999), as well as in drinking water samples from Wushan, China (Jie et al., 2019).

While TER is considered safe for use as a fragrance within specified limits, as assessed by the Research Institute for Fragrance Materials (RIFM) Expert Panel for Fragrance Safety Criteria Document (Api et al., 2017), and its presence in the food supply is not linked to significant risks to human health, according to various international organizations such as the World Health Organization (WHO) or Food and Drug Administration (FDA) (Marnett et al., 2014; World Health, 2014) its environmental effects have received less scrutiny. TER is water-soluble, facilitating interactions with diverse aquatic organisms, potentially resulting in ecotoxic effects and ecological disruptions in aquatic ecosystems. Limited ecotoxicity studies suggest that TER may exert toxic effects on various organisms, including invertebrates, algae, and fish, potentially disrupting physiological processes and adversely affecting growth, reproduction, and survival (Oliveira et al., 2021). For instance, TER exhibits toxicity towards saltwater invertebrates such as *Artemia salina* (LC_{50} ranging from 0.068 to 0.076 µg/L for 24 and 48 hours of exposure respectively) (Negreiros et al.). Extracts rich in terpineol, such as those from *L. schomburgkiana*, have shown significant toxicity to brine shrimp (LC_{50} = 49.6 µg/mL) (da Silva et al., 2009). Furthermore, α-terpineol has been observed to inhibit and induce lethality in algae species such as *Microcystis aeruginosa* and *Chlamydomonas reinhardtii* by degrading their DNA and inducing cell programmed cell death (Chen et al., 2019). Additionally, α-terpineol has been found to induce toxic effects on salmonid fish species, with documented 96-hour LC_{50} values of $6.3 \cdot 10^{-6}$ and $6.6 \cdot 10^{-6}$ µg/L for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* W.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) respectively (Stroh et al., 1998).

On the other way, the environmental occurrence and ecotoxicity of ABXs in aquatic environments are well documented. The presence of, GTM, CHL, TC and FF had been investigated worldwide being detected for example in effluent wastewaters in Europe (Ng et al., 2023) or in urban wetlands in China(Zhang et al., 2023) and may lead to ecotoxicity effects on non-target indicators as has been previously reported. Specifically, GTM has been detected in concentrations ranging from 0.4 to 7.6 µg/mL in wastewater (Löffler and Ternes, 2003; Tahrani et al., 2016). TC has been found in concentration ranging from $2.5 \cdot 10^{-4}$ µg/mL to 1.29 µg/mL FF up to $2.8 \cdot 10^{-3}$ µg/mL in fishponds in China (Song et al., 2016) and in effluents from wastewater treatment plants in Brussels (Lorenzo et al., 2018). CHL was detected in seawater in Tunisia with concentrations up to 15.6 µg/mL and FF up to 18.4 µg/L (Tahrani et al., 2016). It was also found in rivers in India with varying concentrations depending on location, with a maximum of $3.9 \cdot 10^{-5}$ µg/L (Gopal et al., 2021). FF was detected in rivers with mean concentrations of $1.23 \cdot 10^{-4}$ µg/L (Zhang et al., 2020a). FF is also present in areas nearby aquaculture activities, reaching up to $1.6 \cdot 10^{-3}$ µg/mL (Choi et al., 2020).

Studies show that this ABXs have toxic effects on non-target indicators such as *D. magna* and *A. fischeri* (Pino-Otín et al., 2024) and on other organisms such as fish and algae, where even low concentrations can affect growth and reproduction(Park and Choi, 2008; Zhang et al., 2013). Similarly, ABXs can disrupt bacterial communities in waterways, posing risks to ecosystem health (Pino-Otín et al., 2023).

The overall impact of TER and its synergistic combinations with antibiotics on aquatic ecosystems remains poorly understood. Studies on their effects on non-target

organisms are very scarce, and, to our knowledge, entirely absent for whole communities, limiting a comprehensive understanding of their environmental impacts.

This study aims to address this gap by adopting an integrated approach that considers both individual species and communities to evaluate the effects of SACTAs and their compounds (TER and the ABXs CHL, GTM, TC, and FF) in aquatic environments. Specifically, it seeks to: (1) Assess, for the first time, the toxicity of five SACTAs and their individual compounds on non-target aquatic organisms, *Aliivibrio fischeri* and *Daphnia magna*; (2) Conduct a pioneering examination of the toxicity of the five SACTAs and their compounds on riverine microbial communities, analyzed through 16S rRNA gene sequencing.

2. Material and methods

2.1 Reagents

Properties of TER and ABXs used in this investigation (GTM, CHL, TC and FF) can be seen in Table 1.

Solutions were prepared by employing distilled water of high purity (SIEMENS Ultra Clear™). To ensure the adequate conditions for the experiments, the pH of each stock solution was measured utilizing a FiveEasy F20 pH meter.

Synergy solutions studied were formed by TER 125 µg/mL + GTM 3.9 µg/mL against *S. aureus* and *S. agalactiae* (Synergy 1), TER 62.5 µg/mL + GTM 3.9 µg/mL against *A. baumanii* (Synergy 2), TER 125 µg/mL + CHL 15.6 µg/mL against *S. marcescens* (Synergy 3), TER 125 µg/mL + TC 15.6 µg/mL against *S. marcescens* (Synergy 4) and TER 62.5 µg/mL + FF 7.8 µg/mL against *S. aureus* (Synergy 5). MIC and synergies concentrations are shown in table 2.

2.2 *Daphnia Magna* Assay

The investigation of the effect of TER and synergies on *Daphnia magna* followed the established protocol outlined in Daphtoxkit FTM magna (1996), with reference DM121219 from Vidrafoc (Barcelona, Spain), and adhered to OECD 202 (2004) guidelines. To maintain the integrity of the experimental materials, the kit was kept in darkness at a temperature of 5°C until it was required for utilization. Initially, *D. magna* eggs were subjected to a 72-hour incubation period at 22°C under 6000 lx light conditions facilitated by a TOXKIT model CH-0120D-AC/DC incubator (ECOTEST, Valencia, Spain). Following this incubation period, neonates were provided with sustenance in the form of one vial of spirulina microalgae for a period of 2 hours.

Afterward, the neonates were exposed to solutions of TER alone at concentrations of 20, 40, 60, 80 and 120 µg/mL. Additionally, they were also exposed to solutions of TER combined with the ABXs at concentrations corresponding to 100%, 50%, 25%, 12.5% and 0.125% of synergy combinations which TER concentration was 125 µg/mL (Synergies 1, 2 and 3). and to solution of TER combined with ABXs at concentration corresponding to 200%, 100%, 50%, 25% and 0.25% of synergy combinations which TER concentration was 62.5 µg/mL (Synergies 4 and 5). Each solution was dissolved in synthetic freshwater (ISO 6341, 2012).

The pH levels were monitored and kept within the specified range of 7–7.5, ensuring optimal experimental conditions without requiring additional pH adjustments. Each concentration underwent thorough evaluation with five replicates, each consisting of five organisms, while synthetic freshwater served as the negative control. Following a 24-hour exposure period that took place in the same incubator, although under complete darkness, daphnias exhibiting no movement for a period of 15 seconds after gentle agitation were recorded as immobile. These recorded observations were then utilized to compute the LC_{50}, representing the concentration at which 50% lethality was observed.

2.3 *Aliivibrio Fischeri* Assay

Analysis of acute toxicity in *A. fischeri* involved examination of bioluminescence inhibition induced by TER alone and by synergy combinations, following the standardized procedure outlined in (ISO 11348-3, 2007). The specific strain employed for this examination was *A. fischeri* NRRL-B-11,177, acquired from Macherey-Nagel (ref. 945 006, Dueren, Germany). To prepare the *A. fischeri* cultures for testing, lyophilized samples were reconstituted using the provided reactivation solution and then stored at a controlled temperature of 4°C for a brief period of 5 minutes to ensure their viability.

2% NaCl was used to prepare various stock solutions of TER at 100, 10, 1, 0.1 and 0.01 µg/mL. Moreover, they were also exposed to solutions of TER combined with the ABXs at concentrations corresponding to 100%, 50%, 25%, 1.25% and 0.125% of synergy combinations which TER concentration was 125 µg/mL (Synergies 1a, 1b, 2 and 3). and to solution of TER combined with ABXs at concentration corresponding to 200%, 100%, 50%, 2.5% and 0.25% of synergy combinations which TER concentration was 62.5 µg/mL (Synergies 4 and 5).

No adjustments to the pH of the solutions were necessary. The assay was meticulously performed in quadruplicate, employing four separate tubes each containing bacteria along with the respective concentration solution, while an additional tube containing only a 2% NaCl stock solution served as the negative control.

To commence the assay, the initial luminescence level was recorded as a baseline measurement. Following this, a volume of 0.5 mL of each dilution designated for testing was introduced into the respective tubes. Adhering to the recommended timeframe specified in the standard protocol, a subsequent measurement of luminescence inhibition was conducted after a 30-minute incubation period. These measurements were captured utilizing a Biofix® Lumi-10 luminometer (Macherey-Nagel, Dueren, Germany). The conclusion of the test was determined based on the decrease in bacterial light emission. Subsequently, the EC50 values, representing the concentration at which 50% inhibition occurred, were then determined as a percentage of luminescence inhibition and calculated relative to the control.

2.4 *River Microorganisms Community Assay*

2.4.1. River Samples

In the month of May 2024, water samples were collected from the Gallego River, situated in Zaragoza, Spain. These samples were procured with the dual objective of conducting comprehensive genetic and chemical analyses, as well as subjecting them to Biolog EcoPlates™ assays (Tiselab S.L., Barcelona, Spain). The collection and transportation of the samples to the laboratory were conducted in accordance with ISO 19458:2006 procedures, overseen by AENOR using sterile reservoirs. In addition to the collection of samples, a series of in situ measurements of physicochemical parameters were conducted. These measurements revealed a water temperature of 17°C, recorded using a precision Nahita thermometer sourced from ICT S.L. (La Rioja, Spain). The pH of the water was determined to be 7.5 with the use of PanReac AppliChem A011435 (Darmstadt, Germany), Finally, the conductivity of the water was found to be 2.8 mS, measured utilizing a Hanna HI8733 conductivity meter sourced from Merck (Madrid, Spain).

For the purpose of genetic analysis, 5 liters of river water was filtered using a 0.22 µm cellulose nitrate filter sourced from Sartorius (Göttingen, Germany) employing a vacuum flask. The captured microorganisms in this filtration were then reconstituted in a sterile Falcon tube containing 50 mL of phosphate-buffered saline (PBS). Once reconstituted,

the microbial suspension underwent through a centrifugation, exerting a force of 5000 g for a duration of 10 minutes. This centrifugal force effectively separated the microorganisms from the surrounding liquid, resulting in the formation of a distinct pellet at the bottom of the Falcon tube. This pellet, containing the concentrated microorganisms, was then preserved at an ultra-low temperature of -80 °C, ensuring the integrity of the biological material for subsequent genetic sequencing.

In preparation for ecotoxicity assays, 1 L aliquot of river water underwent filtration through a 70 µm nylon sieve sourced from Becton Dickinson (Madrid, Spain) to eliminate debris. Following the filtration process, the water sample was stored under controlled conditions, maintaining a temperature of 4 °C and shielding it from exposure to light to minimize any potential alterations to its chemical composition. This controlled storage environment was essential to preserve the integrity of the water sample, ensuring its suitability for use in Biolog EcoPlates™ experiments.

Additionally, two liters of the same river water sample were delivered to Laboratorios Valero Analítica (Zaragoza, Spain), on the day of sampling. These samples were destined for physicochemical analysis, the findings from this detailed analysis are presented in Table A1.

2.4.2. Genetic Sequencing of River Microorganisms

The genetic preprocessed solution resulting from Sections 2.4.1 underwent for subsequent genetic analysis using the Froilabo, Trust −80 °C system. First DNA was extracted for which the AllPrep® PowerViral® DNA/RNA Kit sourced from QiaGen (Barcelona, Spain) was employed, adhering closely to the manufacturer's recommended procedures. Once extracted, the DNA samples were quantified using Picogreen® fluorimetry. Subsequently, 1.5 ng of DNA from each sample was utilized to amplify the V3-V4 region of the 16S rRNA gene.

The V3-V4 specific PCR, consisting of 21 cycles, utilized Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase sourced from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) and 100 nM primers. Positive 16S-derived bands were assessed through agarose gel electrophoresis, followed by DNA product dilution. A second PCR, comprising 13 cycles, was conducted using 400 nM primers from the Access Array Barcode Library for Illumina Sequencers sourced from Fluidigm (CA, USA) collection. This step finalized the Illumina library construction, assigning each sample a unique barcode. After individual library preparation, samples were sized and concentrated using a Tape Station obtained from Agilent (Madrid, Spain), and an equimolar pool was created. Purification of the pool was done using AMPure beads, and quantification was carried out via quantitative PCR using the "Kapa-SYBR FAST qPCR kit for LightCycler480" sourced from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) alongside a reference standard.

The pool of amplicons underwent denaturation prior to loading onto a flowcell at a concentration of 10 pM This initiated the formation of clusters which were subsequently subjected to sequencing using a "MiSeq Reagent Kit v3" in a 2 × 300 pair-end sequencing run on a MiSeq sequencer.

Following the sequencing process, the resultant fastq files were generated using the bcl2fastq tool integrated into the Illumina sequence workflow. Phylogenetic analysis was then carried out utilizing the 16S Metagenomics app of Base Space v1.1.0 from Illumina (Madrid, Spain), with taxonomic assignment performed using Greengenes (13_5) as the reference database.

2.4.3. Community-Level Physiological Profiling (CLPP) of River Microorganisms

To explore the effects of TER alone and combined with ABXs on microbial community metabolic activity in water, Biolog EcoPlate tests from Tiselab S.L. (Barcelona, Spain) were employed. This approach enabled the observation of alterations in the utilization of 31 distinct carbon sources, as previously documented (MR et al., 2017; Valenzuela et al., 2024). For assessing ecotoxicity, solutions of TER and ABXs separately at synergies and at MIC concentrations and combined at synergies concentrations (See table 1) were prepared in sterile water, and introduced into the wells of a Biolog plate under aseptic conditions.

Prefiltered river water (as described in Section 2.4.1) served as mediums for evaluating the metabolic activity of river microorganisms. The pH of these solutions was maintained within the range of 6 to 7. Each concentration underwent triplicate testing, with all procedures executed under sterile conditions within a controlled environment in a flow chamber. Following preparation, the plates were incubated in darkness at 25 °C for a duration of 7 days, ensuring sterility throughout the experiment.

Optical density (OD) readings at a wavelength of 590 nm were captured immediately post-inoculation and subsequently once per day. Utilizing a Synergy H1 Microplate reader from BIO-TEK (Dallas, TX, USA) with Gen5™ (version 2.0) data analysis software, the assessment of carbon utilization rate was conducted by analyzing the reduction of tetrazolium violet redox, using the methodology specified by Pohland (Pohland, 2009).

2.5. Statistics and Graphic Representation

To construct dose-response curves for *D. magna* mobility and *A. fischeri* luminescence, a logit logistic regression analysis using XLSTAT software (version 2014.5.03, Addinsoft 2024) was employed. This methodology enabled the determination of LC_{50} and EC_{50} values, accompanied by their respective standard errors (SE). The statistical significance of the dose-response models was evaluated using a chi-squared test.

The data collected from the mixture experimental setup were evaluated by comparing the observed effects with the anticipated effects of the mixture, based on two theoretical models: concentration addition (CA) and independent action (IA) which assume the same or different mode of action respectively as described previously (Sigurnjak M, 2021).

CA model was conducted following Equation 1 proposed by Loewe 1926:

$$EC_{pCA} = \left(\sum_i \frac{c_i}{c_{pi}}\right) EC_p \quad (1)$$

Here, EC_{pCA} represents the theoretical p percent inhibition, while c_i indicates the concentration of the ith toxicant in the test mixture and c_{pi} denotes the concentration of the individual toxicant in a single-toxicant solution that results in p percent inhibition of the tested microorganism EC_p.

IA model on the other hand was applied using Equation 2

$$EC_{pIA} = [1 - \prod_i (1 - c_i \cdot EC_i)]/c_{mix} \quad (2)$$

In this case, EC_{pIA} represents the theoretical p percent inhibition obtained assuming that c_i indicates the concentration of the ith toxicant in the test mixture, EC_i denotes inhibition caused by c_i alone in a single-toxicant solution and c_{mix} is the sum of the concentrations of all the components of the mixture solution that is going to be tested.

Experimental models results were compared graphically to identify synergism (enhanced effect), antagonism (reduced effect) or additivity (similar effect)

depending on whether the experiential curve fell above, below or closely matched the curves of both models, respectively.

Meanwhile, the quantification of microbial activity for each Biolog EcoPlate was conducted through the Average Well Color Development (AWCD) method, following the procedures detailed by Garland and Mills (JL and AL, 1991), as referenced in earlier investigations (Pino-Otin et al., 2021).

The results were visually depicted using suitable visualization methods, and Equation (3) was utilized:

$$AWCD = \sum_{i=0}^{i=7} (OD_{t=xi} - OD_{t=x0}) \quad (3)$$

ODi represents the optical density value from each well at any given time after subtracting the initial optical density ($OD_{t=x0}$) from the optical density at that time point ($OD_{t=xi}$ of that well.

The comparison of AWCD values among the three replicates and the determination of differences' significance were conducted through a Student's t-test for two independent samples, performed using XLSTAT software (version 2014.5.03). The coefficient of variation (CV) was employed to evaluate the relative dispersion of absorbance data across the three replicates.

Subsequently, AWCD curves were applied to a logistic model (Equation (4)) for describing sigmoid microbial growth, as detailed in earlier studies (Pino-Otín et al., 2019), utilizing the Excel Solver (Microsoft 365) add-in.

$$AWCD = \frac{Cmax}{1 + e^{b-rt}} \quad (4)$$

In this context, Cmax denotes the maximum attainable population density, while r signifies the intrinsic rate of population growth and b serves as a fitting parameter within the model.

4. Results and Discussion

In this study, we investigated the ecotoxicity of five SACTAs between TER and four widely used ABXs (see Table 1)., which had previously shown high antimicrobial efficacy against pathogenic bacteria (Valenzuela et al., 2024, submitted). These combinations could offer an effective alternative to reduce ABX consumption and address the issues of ABX toxicity and resistance development. On one hand, we used indicator organisms such as *D. magna* and bacteria like *A. fischeri*, in a simplified scenario that allowed us to analyze the role of each component in the combination, comparing it to their individual toxicity. On the other hand, a more environmentally realistic study was conducted using microbial communities from a river.

4.1 Ecotoxicology of Terpineol in *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*

The results show that TER alone is more toxic to these individual organisms than the four ABXs tested, based on their LC_{50} values (Table 2 and Figure 1).

The toxicity of all the compounds increases with exposure time, nearly doubling that of TER, indicating a rapid mode of action. Among the ABXs, CHL is the most toxic, followed by FF and TC, which have very similar values, while GTM is the least toxic.

For *A. fischeri*, only the effects of exposure to CHL and TER were represented, as the LC_{50} > 1000 µg/mL in the cases of GTM and FF (Table 2). The synergies involving TC could not be tested with *A. fischeri* as its color interferes with the luminescence measurements.

To our knowledge, this is the first time ecotoxicity (LC_{50}) values for TER have been reported for these two aquatic organisms. However, in previous studies, we have observed that other natural products of plant origin with antimicrobial activity, such as hydroquinone, tannic acid, or eugenol, also exhibited higher toxicity compared to these and other commercial ABXs, within ranges of 0.142 to 32.03 µg/mL for *D. magna* (24h) and 1.44 to 22.00 µg/mL for *A. fischeri*. Therefore, TER would actually be the least toxic among these natural products for *D. magna* and one of the least toxic for *A. fischeri* (Ferrando et al., 2024; Pino-Otin et al., 2023b; Valenzuela et al., 2024).

TER is a monoterpenoid alcohol that is water-soluble (2.54 g/L at 20 ºC), which enhances its bioavailability. Its low molecular weight (254.25 g/mol) and lack of molecular charge at physiological pH, as it is a weak acid (Table 1) facilitates its passage through cell membranes. Like other monoterpenes, TER interacts with phospholipid membranes, altering the organized lipid bilayer and disrupting the lipid fraction of the plasma membrane (Huang et al., 2021a; Trombetta et al., 2005). This disturbance increases cellular permeability, ultimately leading to cell death in the organisms (Oyedemi et al., 2009; Yang et al., 2014), which may explain its high toxicity found for both bioindicators.

In the case of *D. magna*, TER may potentially affect them through surface contact, as its hydrophobicity (high Log Ko/w, see table 1) facilitates its adherence to cell membranes, as well as through their diet, since they are filter feeders, making them more vulnerable to environmental changes (Orchard et al., 2002; Zhang and Baer, 2000). Its lipid-dissolving capacity and moderate volatility (Li et al., 1995) may cause TER to accumulate at air-water interfaces, increasing its uptake by aquatic organisms and thereby enhancing its toxicity.

For the bacterium *A. fischeri*, its low molecular weight and small size may enable it to pass through the porins of outer membrane in gram-negative bacteria and reach the periplasmic space. Thus, membrane disruption could occur in two places: at the plasma membrane and the outer membrane of the gram-negative cell wall, promoting TER entry into the cell (Huang et al., 2021a), potentially leading to further damage to internal organelle membranes, such as those of mitochondria (Sikkema et al., 1994). Such effects have been documented in *E. coli* exposed to TER, where cytoplasmic leakage, nuclear area deformation, and plasmolysis of the cells were observed (Li et al., 2014).

The four ABXs studied have a broad spectrum of activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, and all of them bind to bacterial ribosomes (GTM and TC to the 30S subunit, and CHL and FF to the 50S subunit), inhibiting protein synthesis, although through slightly different mechanisms: CHL blocks the formation of peptide bonds during translation, GTM induces errors in mRNA translation, TC prevents the binding of transfer RNA (tRNA) to the ribosomal complex, and FF blocks translocation, interfering with the ribosome's movement along the mRNA and the proper assembly of proteins. (Kapoor et al., 2017, Zhang et al., 2008)

The results indicate moderate toxicity of ABXs toward both bioindicators, with *D. magna* showing slightly higher sensitivity, consistent with findings from other studies (Czech et al., 2014). The literature includes several studies that report LC_{50} values for *D. magna* and *A. fischeri*, many of which align with our results, although variability in the values is also observed (see Table 2).

4.2 Ecotoxicity of SACTAs in *Daphnia magna and Aliivibrio fischeri*

Toxicity curves were generated to calculate LC_{50} SACTAs values as percentages, and their ecotoxicity can be compared in Figure 2 for *D. magna* and *A. fischeri*, respectively.

To facilitate the comparison of the SACTA results with the original compounds, the results obtained as percentages have been converted to µg/mL based on the original concentrations of the solutions (Table 2). After 48 hours, the toxicity for *D. magna* in µg/mL from highest to lowest was SACTA 3 > SACTA 1 ≈ SACTA 4 > SACTA 2 ≈ SACTA 5. In the case of the bacterium *A. fischeri*, the results are quite similar: SACTA 3 > SACTA 1 > SACTA 5 > SACTA 2.

As shown, the SACTAs exhibited varying degrees of toxicity depending on the ABX used, with the combination involving CHL being the most toxic to both indicators, as was the case with CHL as a standalone ABX. On the other hand, FF and GTM, both of which contain lower doses of TER compared to the other formulations, show lower toxicity. This highlights the significant contribution of TER to the toxicity of SACTAs.

If we compare the LC_{50} values (µg/mL) of the SACTAs with the LC_{50} concentration of the ABXs alone (see Table 2)**, we observe that the combinations exhibit greater toxicity.** However, these combinations remain within the toxicity range of TER alone, suggesting that the primary contributor to the toxicity of the combinations is likely the TER component.

Since these five SACTAs were selected because of their synergistic antimicrobial activity, it was expected that the combinations would also synergistically increase their toxicity, particularly in the case of the bacterium *A. fischeri*. However, what we observed was a **complex pattern of interactions**, which are described in the following sections.

4.2.1. SACTAs with Synergistic Toxicity

The only synergy detected for *D. magna* occurs with the combination of SACTA 3 with CHL, the most toxic ABX and mixture studied, as discussed in the previous section. In Figure 3c, it can be seen that the predictive models estimate a lower expected toxicity for *D. magna* than is observed experimentally. This suggests that distinct interference mechanisms are influencing toxicity in this case compared to others. Another synergistic interaction is observed with *A. fischeri* (Figure 3f); however, at higher concentrations, the experimental toxicity appears to decrease relative to the predicted values.

Other studies have indicated that mixtures of antimicrobial products can lead to complex interactions that modify the toxic action mechanisms of each component, increasing ecotoxicity in *D. magna* and *A. fischeri*. For example, combinations of ABXs showed that the most toxic binary combinations on *D. magna* were those involving CHL (Zhang et al., 2021a). In other studies, joint exposure to multiple ABXs, pharmaceuticals and phytosanitary products increases toxicity even when individual compounds are present at low concentrations (Cedergreen et al., 2006; Hernando et al., 2003; Srain et al., 2021).

The effect of CHL on *A. fischeri* can be explained by its lipophilicity (LogKo/w) and water solubility (see Table 1), which facilitates its passage through the outer membrane and the cell membrane, allowing it to move easily through the cytoplasm to reach its ribosomal target. The effectiveness of this ABX in gram-negative bacteria, such as *Aliivibrio*, may be enhanced by its ability to cross the outer membrane through porins and its efficient intracellular activation. For example, the reduction of porins in bacteria such as *Haemophilus influenzae* (Burns and Smith, 1987) or mutations that decrease porins in bacteria like *Klebsiella* (Gutmann et al., 1985) significantly reduce permeability to CHL, suggesting that these proteins facilitate the entry of this ABX. Additionally, the incorporation of certain chemical groups, such as diglycine, into chloramphenicol accelerates its activation once inside gram-negative bacteria, increasing its antibacterial efficacy against these organisms (Wang et al., 2019).

In synergy, the combined effect of cellular membrane disruption caused by TER and its ability to destabilize cellular permeability by affecting the lipid bilayer, along with the permeabilizing capacity of the ABX, undoubtedly explains the increased damage on *A. fischeri* of SACTA 3 and, consequently, this accounts for its elevated toxicity compared to the individual actions of each component alone that we observed. For example, mixtures that include chlorine and other substances exhibit synergistic increases in toxicity towards *A. fischeri*, suggesting that the combination with TER could amplify these toxic effects (Rosal et al., 2010).

Furthermore, the generation of oxidative stress and the inhibition of bacterial resistance mechanisms would amplify the toxic effects of both compounds on *A. fischeri*. This mechanism has been observed in various studies where the production of reactive oxygen species (ROS) in the presence of antimicrobials such as CHL increases toxicity in sensitive bacteria (Albesa et al., 2004). The combination could also inhibit bacterial resistance mechanisms, such as efflux pumps, which typically expel CHL from the cell (Hou et al., 2019), or the pathways generating inactivating enzymes for CHL, such as chloramphenicol acetyltransferase, which has been reported to modulate resistance in bacteria like *Aliivibrio parahaemolyticus* (Zhang et al., 2019b). If TER interferes with these mechanisms, the bacteria would be more exposed to the ABX, thereby reducing the LC_{50}, which is the observed effect. Additionally, TER may have further damaging effects on the membranes of cytoplasmic organelles (Sikkema et al., 1994), which would simultaneously affect multiple cellular pathways, leading to a more rapid cellular collapse, as has also been observed with the combination of other ABXs (Bubrick et al., 1983).

Although primary action of the CHL is directed at bacteria, this ABX can also have side effects on eukaryotic organisms, such as *D. magna*, including **oxidative damage, effects on reproduction, cellular toxicity, and bioaccumulation.** For example, CHL can cause tissue damage in *D. magna* after acute exposures, with oxidative damage observed in the cells following 24-hour exposures to sublethal concentrations, along with significant accumulation in the tissues (Zhang et al., 2019d) and cellular stress (Zhang et al., 2021b). This ABX shows adverse effects on the reproduction of *D. magna* after prolonged exposures of 21 days, with pronounced effects on fecundity and developmental delays (Czech et al., 2014).
This effect of the ABX, along with the ability of TER to penetrate biological barriers and the possible increase in oxidative stress, may explain the synergistic effect of the two compounds in combination. An increase in oxidative stress-related toxicity in *D. magna* has been observed, for example, in combinations of microplastics and ABXs (Zhang et al., 2019c) and in combinations with other substances (Liu et al., 2018). Furthermore, in the case of this cladocera, the permeability effect will be exacerbated by intake through its filtering activity (Tkaczyk et al., 2021).

4.2.2 SACTAs with Antagonistic Toxicity.

Figures 3b and 3e present the effects on *D. magna* exposed to SACTA 2 and 5 (with GTM and FF, respectively), showing that the predicted toxicity is greater than the experimentally observed toxicity, which indicates an antagonistic interaction. Table 2 also lists the concentrations of each component in the combinations exhibiting synergy. Although predictive models could not be represented for *A. fischeri*, antagonistic interactions can be inferred for SACTA

1, 2, and 5, as the LC_{50} of the synergy is higher than that of TER, one of the components of the combination (see Table 2).

The mechanism of action of GTM suggests that it can permeate the cell wall and membrane of gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa* (Rapoport et al., 1999). This process relies on the composition of the bacterial outer membrane, which can significantly influence its effectiveness. Although GTM is relatively large (Table 1), its highly positive charge at neutral pH allows it to displace magnesium and calcium ions bound to lipopolysaccharides (LPS), thereby disrupting the outer membrane of gram-negative bacteria. Once the outer membrane is compromised, GTM penetrates the bacterial inner membrane via aerobic metabolic enzyme systems, creating an electrical gradient across the membrane (Mingeot-Leclercq et al., 1999). However, in *A. fischeri*, the outer membrane's LPS structure may be less susceptible to GTM's destabilizing effects, potentially reducing its efficiency. Like other gram-negative bacteria, *A. fischeri* could also limit outer membrane permeability by modifying porins, thereby restricting ABX entry (Martins et al., 2013b). This mechanism may explain the high LC_{50} values observed when GTM is used alone. Moreover, *A. fischeri* employs quorum-sensing systems to regulate biofilm formation, which may further enhance its resistance to GTM (Morris and Visick, 2013).

On the other hand, FF has a relatively low molecular weight, which allows for passive diffusion through the lipid bilayer. Additionally, its moderate lipophilicity enables it to dissolve in both lipid-based and aqueous environments. This permeability may contribute to its toxicity effects on *D. magna*, which are similar to those of tetracyclines, and can be further enhanced by ingestion of the compound by this invertebrate. According to the literature, FF seems to cause several adverse effects in *D. magna*, including oxidative stress (Zhang et al., 2019d), reproductive toxicity (Martins et al., 2013a), alteration of the gut microbiome, and possibly effects on mitochondrial function and the endocrine system (Li et al., 2018b).

Regarding *A. fischeri*, FF exhibits low toxicity when acting alone compared to the other ABXs. This may be due to different resistance mechanisms. For instance, a computational study identified that acetyltransferase, an enzyme common in *Aliivibrio* spp., can reduce the effectiveness of FF by inactivating it (Ratul et al., 2022). Furthermore, *A. fischeri* may increase the expression of efflux pumps that expel this ABX in response to FF exposure (Kadlec et al., 2007; Sandoval et al., 2016).

When combined, there could be several reasons that explain the antagonistic effect on the toxicity of the GTM and FF combination with TER. As an aminoglycoside, GTM can form physical or chemical interactions with other compounds, such as TER, reducing its availability in the aqueous medium. Although, to our knowledge, no specific studies have directly explored the formation of complexes between GTM, FF, and TER, such interactions have been reported in combinations between ABXs and other chemicals (Lesniak et al., 2005). Moreover, in the presence of GTM and FF, organisms may activate biotransformation pathways that alter the metabolism of TER, potentially making it somewhat less toxic while still retaining its ability to damage cellular membranes. While no specific information exists for TER in combination with GTM or FF, similar phenomena have been observed in studies on the toxicity of other compound mixtures. For instance, in the case of pesticides, antagonism can occur due to enzymatic inhibition that slows down the biotransformation of pesticides into their more toxic forms, resulting in a reduced combined toxicity of both compounds in *D. magna* (Cedergreen et al., 2006; Rider and LeBlanc, 2005).

4.2.3. SACTAs with Additive Toxicity:

This applies to *D. magna* exposed to SACTAs 1 and 4 with GTM and TC respectively. As shown in Figure 3a and 3d, the predictive toxicity models align with experimental observations, indicating no interaction in the mechanisms of action of both substances, and the effect corresponds to the sum of their individual toxicities. In Figure 3a, (SACTA1) the experimental data show slightly lower toxicity than predicted. However, when examining the 48-hour LC_{50} values for *D. magna* (Table 2) exposed to SACTA 1, the confidence intervals overlap with the predicted values, indicating that this minor difference is not significant and that the effect is indeed additive.

As mentioned in the case of GTM, tetracyclines (TC) have a relatively small size (see Table 1), allowing them to enter eukaryotic cells through passive diffusion, which impacts organisms like *D. magna*. Moreover, TC's amphipathic structure enables it to cross lipid-rich cell membranes and its pKa allows it to exist in a neutral or partially charged form at physiological pH, facilitating diffusion across membranes. TC can also form complexes with cations such as magnesium and calcium, which may influence how it binds to and crosses certain cellular barriers (Carlotti et al., 2012). Additionally, eukaryotic cells possess transporter proteins that regulate the movement of molecules, including tetracyclines. For instance, organic anion transporters (OATs) play a role in the uptake of TCs in specific cell types (Kobayashi et al., 2005). Notably, (Kim et al., 2014) showed that TC bioaccumulates more through aqueous uptake than through dietary intake in *D. magna*, and that this ABX affects the gut microbiota, potentially disrupting the organism's energy homeostasis. Moreover, in multigenerational exposure, TC induced distinct stress-related transcriptional responses in daphnids, affecting translation, protein and carbohydrate metabolism, and oxidative phosphorylation (Kim et al., 2017).

Other studies have shown additive effects in mixtures of antimicrobials. For example, in the case of triclosan and triclocarban, the results showed that the observed mixture toxicity had no significant differences from those predicted models (Villa et al., 2014).

Therefore, toxicity studies of combinations of two antimicrobials using individual indicator organisms show that complex toxic effects can occur, which not only result from additive effects but also include synergies and antagonisms, depending on the combined mechanisms of action. These complex interactions have also been reported in combinations with other substances such as organotin compounds (Kungolos et al., 2002), ZnO and CuO nanoparticles (Heinlaan et al., 2008) and pesticides(Cedergreen et al., 2006).

4.3 Impact of SACTA on Riverine Microbial Populations

This complexity intensifies when studying microbial communities obtained from a river. Using Biolog assays, we can assess changes in the growth and metabolic profile of the microbial community resulting from exposure to antimicrobial combinations, which serves as an excellent and realistic indicator of the potential environmental impact that the dispersion of these compounds could have on river ecosystems.

Microorganisms are an essential link in the riverine food web, playing a key role in biogeochemical processes such as nutrient recycling, organic matter decomposition, nutrient cycling, and the regulation of greenhouse gases. All of these functions are fundamental to maintaining the ecological balance of rivers. Therefore, any changes within these communities will have repercussions throughout the entire river ecosystem **(Battin et al., 2008)**.

In the bacterial taxonomic analysis of water samples from the Gállego River (Figure 4), identification rates were very high, with over 90% of taxa identified down to the genus

level, though only 24.07% were identified at the species level. The identified microorganisms are highly representative of microbial populations typically present in these types of ecosystems (Madigan et al., 2015), with a predominance of *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Actinobacteria*, indicating a prevalence of gram-negative bacteria. An additional 4.52% of bacteria remain unidentified, underscoring the high taxonomic diversity of these ecosystems. Furthermore, these bacterial taxa exhibit significant metabolic diversity, including chemoorganotrophic organisms that can be strict aerobes, facultative anaerobes, or strict anaerobes, as well as nitrogen-fixing organisms.

The phylum *Proteobacteria* is among the most abundant of gram-negative bacteria, representing around 40% of bacterial communities in freshwater environments (Battistuzzi and Hedges 2009). These are fast-growing species that respond rapidly to organic nutrient pulses. The classes *Betaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* are typically the most common in freshwater environments, followed by *Gammaproteobacteria* (Pino-Otin et al., 2021), as observed in our samples. Nearly all *Betaproteobacteria* belong to the order *Burkholderiales*, consistent with their abundance in other rivers ríos (Beale et al., 2017; Pino-Otin et al., 2021; Staley et al., 2015). *Alphaproteobacteria* are more competitive under low-nutrient conditions, allowing them to thrive in oligotrophic waters (Madigan et al., 2015). The predominant orders within this class are *Rhodobacterales* and *Sphingomonadales,* which are also dominant groups in other Spanish rivers (Aguirre et al., 2017). Among the *Gammaproteobacteria*, the most abundant order in our samples was *Enterobacteriales,* a group of bacteria with versatile metabolisms known for their ability to utilize a wide range of carbon and nutrient sources, enabling them to adapt to diverse environmental conditions (Zhang et al., 2020b).

The phylum *Bacteroidetes* plays a crucial role in riverine metabolism due to its ability to decompose complex organic matter. The predominant members in our samples belong to the classes *Flavobacteria* and *Sphingobacteria*, which are particularly active in breaking down high-molecular-weight polymers, such as carbohydrates and proteins, in aquatic habitats (O'Sullivan et al., 2006). They are also frequently found in urban rivers (Jin et al., 2018; Narciso-da-Rocha and Manaia, 2016).

Finally, *Actinobacteria*, nearly all from the order *Actinomycetales*, play a vital role in river ecosystems by participating in the decomposition of organic matter and biogeochemical cycles, such as those of nitrogen and carbon (Zhang et al., 2019a). In contaminated environments, *Actinomycetales* demonstrate a strong ability to adapt and colonize specific ecological niches, including those with heavy metals and organic pollutants (Duran et al., 2015).

The effects of the five SACTAs on the growth of riverine microbial populations (measured as AWCD) are illustrated in graphs a1 of Figures 5 to 9. These graphs depict the growth kinetics of the same bacterial population exposed to the SACTA combinations (red curve) and their two components at synergy concentration (SC): TER (light green) and ABX (light blue). The black curve represents the negative control (bacteria not exposed to any antimicrobials). To better characterize the kinetics of the curves, the Cmax and r values for each one were calculated, as shown in Graphs a2 of Figures 5 to 9. Additionally, the percentage reduction in Cmax for each curve relative to the control is indicated. The final column presents a comparison of the percentage reduction in Cmax between SACTA and its two individual components (ABX and TER). The results were classified as *synergy* if the Cmax reduction observed for SACTA exceeded the expected sum of the reductions for the individual components, *antagonism* if it was lower, and *additivity* if the values were similar.

Finally, the study examines the impact of all conditions on the metabolism of five groups of metabolites (Polymers, Carbohydrates, Carboxilic and Ketonic Acids, Amino Acids, and Amines/Amides), providing insights into the metabolic profile changes of the riverine microbial population Figures 5b-9b.

The results show that the five SACTAs have a lesser or similar effect on growth compared to ABX at its MIC concentration (see Table 1). In contrast, TER at its MIC is the most toxic product in all cases. Moreover, the toxicity of the SACTAs on microbial communities is markedly different from that observed in individual organisms. According to the decrease in Cmax values compared to the control (see Table a2 in Figures 5 to 9), the toxicity ranking from highest to lowest is as follows:SACTA 5 > SACTA 1 > SACTA 4 > SACTA 3 > SACTA 2. Thus, SACTA 5 with FF (and not with CHL) is now the most toxic to riverine microbial communities.

When comparing the toxicity of the SACTAs with that of ABX or TER alone at CS, we observe additive effects in toxicity, primarily antagonistic effects, with no evidence of synergy. This contrasts with the results seen *D. magna* and *A. fischeri*.

To our knowledge, this is the first study examining the combined toxicity of an antimicrobial combination of PN + ABX on riverine bacterial populations. While a few studies have explored the effects of commercial ABX combinations on environmental benthic microbial communities, these studies also report differences in toxicity between individual organisms and populations (Hagenbuch and Pinckney, 2012).

Many studies on commercial ABX combinations tend to highlight synergistic effects on the toxicity of aquatic microorganisms (Gonzalez-Pleiter et al., 2013; Menz et al., 2017; Munch Christensen et al., 2006; Proia et al., 2013), which contrasts with our findings regarding combinations with TER.

4.3.1 SACTAs with Antagonistic Toxicity Effects in Riverine Microbial Communities

In SACTAs 2, 3, and 4 containing GTM, CHL, and TC, respectively (Figures 6a1–8a1), Cmax values decrease by 16.52-41.56% compared to the control. This reduction is lower than expected from the combined effects of ABX or TER alone (Figures 6a2–8a2b), indicating that the toxicity of the mixture is less than the sum of its components. Antagonistic toxicity between two commercial ABXs is rare, though some studies have noted antagonism in resistance generation(Ding and He, 2010).

Additionally, TER shows higher toxicity than the combination, both at its MIC concentration and at CS, while ABXs display toxicity only at their MIC concentration. Previous studies have found that both CHL and TC, when acting alone, exhibit high toxicity toward riverine microbial communities, significantly impacting both growth and metabolic profiles (Pino-Otin et al., 2023a). TC can even destroy the integrity of sludge in wastewater treatment plants, leading to floc disintegration and cell rupture (Liao et al., 2021).

Interestingly, this SACTAs show toxicity similar to or even lower than that of ABX at its MIC- particularly in combination 2 (GTM) and 3 (CHL)- suggesting that, from an environmental perspective, these combinations could be viable alternatives to using ABX alone.

Regarding metabolic profiles (Figures 6b–8b), the ability to metabolize polymers and carbohydrates is the most affected, with significant reductions across all cases. The largest declines are observed with GTM and TER at their MICs alone, while synergistic effects are diminished, reflecting the

observed antagonistic effect on growth. The studied bacterial communities exhibit diverse species with varying ABX and TER sensitivities, leading to less predictable effects than in monoculture studies (Kulik et al., 2023). The community includes both gram-negative (e.g., Proteobacteria, Bacteroidetes) and gram-positive bacteria (e.g., actinobacteria), presenting structural differences in compound permeability and a wide range of metabolic pathways. This diversity likely enhances the effects observed in *A. fischeri*, where one product of the combination may detoxify the other. Furthermore, since TER and ABXs act through different mechanisms, they can alter microbial community structures, impacting community homeostasis and producing non-synergistic effects on metabolic profiles. Notably, TER + ABX combinations reduce growth but do not completely eliminate it (except perhaps in SACTA 4), suggesting differential survival mechanisms, with less-sensitive bacteria replacing more-sensitive strains. For instance, FF can alter aquatic bacterial community structure (Zhang et al., 2022). Environmental bacteria also exhibit high potential for developing resistance to these ABXs (Ortega et al., 2006; Roberts and Schwarz, 2016; Uddin et al., 2015), which may occur through various evolutionary and adaptive processes in exposed bacterial communities.

4.3.2 SACTAs with Additive Toxicity Effects in Riverine Microbial Communities

In SACTA 1 (TER 125µg/mL+GTM) and 5 (TER 62.5 µg/mL +FF), the toxic effect on growth appears additive when compared to the individual impacts of TER and ABX (Figures 5 a1 and 9 a1). For SACTA 1, the observed decrease (59.64%) closely matches the combined reductions of TER and ABX (64.04%). Similarly, SACTA 5 shows a reduction of 75.15%, aligning closely with the summed individual effects (73.99%) (Figures 5 a2 and 9 a2). These results suggest that ABX and TER independently affect the growth of riverine bacteria through their distinct mechanisms, producing additive effects, unlike their impact on pathogenic bacteria (Figure 1). Similar findings have been reported in studies of limnic bacterial communities, where increased toxicity in ABX mixtures was largely attributed to additive effects (Brosche and Backhaus, 2010). Here, the SACTA combinations exhibit a toxicity level comparable to ABX at its MIC, suggesting that SACTA would not be more harmful from an environmental impact

Regarding the impact on substrate metabolism, a similar pattern to the decline in growth capacity is observed. In SACTA 1 and 5, the reduction in metabolic capacity is additive relative to TER and either GEN or FF at their respective CS levels, noticeable at 48 hours and increasing over time. This reduction primarily affects the metabolism of polymers and carbohydrates across all cases. Interestingly, GTM at CS (3.9 µg/mL) shows a slight hormetic response, enhancing bacterial growth after 144 hours. In aquatic environments, such low antimicrobial concentrations may drive bacterial adaptations, potentially accelerating growth or promoting resistance (Iavicoli et al., 2021). At higher concentrations (MIC), however, TER, GTM, and FF significantly impact the metabolic profile of riverine microorganisms, consistent with other studies showing a dramatic effect on bacterial community structure, significantly reducing both diversity and abundance, especially with FF and GTM at MIC levels or higher (Pino-Otin et al., 2023a; Pino-Otin et al., 2024; Zhang et al., 2022). For example, high concentrations of FF significantly reduce the richness and diversity of denitrifying bacteria in aquatic environments, thereby disrupting the nitrogen cycle (Zhang et al., 2023).

Interestingly, certain *Acinetobacter* strains (order *Pseudomonadales*, comprising 8.60% of identified Gammaproteobacteria) are known to thrive in the presence of high FF concentrations (Zhang et al., 2022). Our samples likely contain bacteria with high tolerance to this ABX, potentially mitigating any synergistic effects and resulting in only additive toxicity, as observed. Furthermore, the diverse bacterial community, combined with the less specific, membrane-disrupting and oxidative stress-inducing action of TER, may not effectively complement the mechanisms of all ABXs across different taxa, thereby reducing the likelihood of synergy.

4.4 Are SACTAs Ecotoxicologically Friendly Compared to ABX Alone?

This study suggests that TER + ABX mixtures could be equally or even less toxic than ABXs alone at their MIC concentration, making these combinations potentially effective therapeutic alternatives that reduce ABX usage.

However, in individual organisms like *D. magna* or *A. fischeri*, this benefit is not as clear. SACTAs generally showed higher toxicity in terms of LC_{50} (µg/mL) compared to ABX alone. However, when comparing the LC_{50} values of SACTAs with the MIC of the ABX, they fall within the same range for FF, are less toxic for GTM, and are only more toxic in the case of the mixtures with CHL and TC.

In addition to antagonistic interactions observed in these individual organisms, we found additive and even synergistic interactions that could increase toxicity to individual organisms. In contrast, when examining complex, highly diverse river microbial communities, which more accurately reflect real-world ecological interactions, SACTAs appear much less harmful. Toxicity assessments based on growth and metabolic profiling of river microbial communities showed that these mixtures only exhibited additive and antagonistic interactions, not synergistic ones, and displayed toxicity comparable to or lower than the ABX at its MIC.

TER, one of the SACTA components, showed higher toxicity than ABXs for both individual organisms and riverine microbial communities. However, environmental concentrations of TER, detected in wastewater effluents at levels ranging from 2.5x10-2 to 7.605x10-3 µg/L (Simonich et al., 2002), are well below its LC_{50}, suggesting acute toxicity is unlikely. Additionally, SACTA use reduces TER to 12.5–25% of its MIC, and TER likely persists less in the environment compared to ABXs, which are designed for stability. For instance, TC can persist in river water for over four days (Liu et al., 2019), while FF and CHL are also stable, especially in low-oxidation environments, with low hydrolysis rates that contribute to their persistence as active contaminants in water bodies (Chang and Ren, 2015; Mitchell et al., 2015; Yin et al., 2018). Although less well-documented, TER's rapid biodegradation in aerobic systems suggests it may decompose more quickly under favorable conditions than ABXs (Yao et al., 2019). TER is also classified as readily biodegradable under OECD 310 guidelines (https://echa.europa.eu/es/registration-dossier/-/registered-dossier/22822/5/3/2).and has a more general mechanism of action, making it less likely to contribute to resistance in freshwater ecosystems (Lewis and Ausubel, 2006).

The other SACTA component, the ABX itself, typically has LC_{50} values well above its MIC, indicating that acute toxicity is unlikely during therapeutic use. Environmental concentrations of ABXs generally range from 1 to 15 µg/mL (Tahrani et al., 2016). However, long-term, low-dose exposure to these ABXs in the environment can accumulate, creating chronic effects on aquatic microbial populations. Studies show that prolonged exposure to low doses of CHL and FF can disrupt aquatic microbial communities (Lai et al., 2009). FF, for instance, causes dysbiosis in fish gut microbiota, reducing bacterial diversity and altering liver metabolism, illustrating the long-term ecological impact of these ABXs(Qian et al., 2021). Additionally, synergistic and additive effects in ABX mixtures, such as CHL with other ABXs, can increase toxicity (Brosche and Backhaus, 2010).

A significant advantage of SACTAs is their ability to reduce ABX doses by approximately 75%, which helps mitigate the risk of resistance gene spread. For example, exposure to FF has been shown to increase ABX-resistant bacteria and resistance genes in rivers and aquatic microcosm models, impacting freshwater bacterial ecology (Gordon et al., 2007; Zhang et al., 2022). TC has similarly been associated with resistance gene propagation, which has severe environmental consequences (Roberts and Schwarz, 2016). Studies in suburban rivers in China found TC resistance genes, highlighting both its toxicity and the proliferation of resistant bacteria (Jiang et al., 2013). Resistance genes for CHL and GTM have also been found in water samples from Germany, Australia, China, and Iran (Aali et al., 2019; Dang et al., 2008; Stoll et al., 2012; Wang et al., 2018).These findings suggest a widespread presence of resistance genes in aquatic ecosystems, posing long-term environmental challenges due to ABX persistence in surface waters. Therefore, reducing the environmental release of ABXs remains a priority, and SACTAs provide a promising option, lowering ABX concentrations to about 25% of their MIC.

5. Conclusions

This study aimed to evaluate the toxicity of five SACTA combinations on aquatic organisms, as these combinations had previously shown synergistic antimicrobial effects against pathogens and could reduce the required ABX doses.

The study identified CHL as the most toxic ABX on *A. fischeri* and *D. magna*, both when used alone and as part of a SACTA. SACTAs on these indicators displayed complex interaction patterns, including synergy, addition, or antagonism, depending on the ABX involved. The LC_{50} values for SACTAs indicate greater toxicity than ABX alone; however, this combined LC_{50} only exceeds the toxicity of ABX at its MIC for CHL and TC. In other cases, the toxicity of the SACTA mixture is within the same range or even lower.

Remarkably, when examining toxicity effects in river microbial communities, the study observed differing toxicity patterns. In these environments, the SACTA containing FF was the most toxic, and interactions were found to be antagonistic or additive rather than synergistic. Additionally, the LC_{50} values for SACTAs are higher in all cases than the LC_{50} of ABX alone, likely due to the high taxonomic diversity within these communities, which provides structural and physiological resilience. This finding suggests that, in complex and realistic environments, SACTAs may indeed be less toxic than traditional ABXs, which tend to persist and accumulate in ecosystems, increasing the likelihood of harmful interactions. SACTA exposure led to reduced substrate metabolism in microbial communities, particularly affecting their ability to break down polymers and carbohydrates, which mirrored declines in microbial growth. This highlights the importance of investigating interactions between natural products and ABXs in realistic, complex settings, where responses may differ significantly from those observed in monocultures or simple ABX pairings.

TER showed higher toxicity than ABXs or SACTAs in tests on both individual organisms and riverine microbial communities at its MIC concentration. However, TER appears to have lower environmental persistence than ABXs, with LC_{50} values that far exceed typical environmental levels, and is used in synergistic applications at only 25% of its MIC.

Taken together, these findings suggest that TER + ABX combinations could offer a viable alternative to traditional ABXs, with comparable efficacy and potentially lower environmental impact. The reduced ABX concentration in these mixtures could also decrease the risk of resistance development.

REFERENCES:

Aali R, Baragh S, Asgari E, Fard RF, Izanloo H, Hosseinpoor S, et al. Tracking of chloramphenicol, erythromycin, and sulfamethoxazole antibiotic-resistant bacteria from untreated wastewater effluents to receiving river. Environmental Health Engineering and Management Journal 2019; 6: 89-96.

Aguirre M, Abad D, Albaina A, Cralle L, Goni-Urriza MS, Estonba A, et al. Unraveling the environmental and anthropogenic drivers of bacterial community changes in the Estuary of Bilbao and its tributaries. Plos One 2017; 12.

Albergamo A, Costa R, Bartolomeo G, Rando R, Vadala R, Nava V, et al. Grape water: reclaim and valorization of a by-product from the industrial cryoconcentration of grape (Vitis vinifera) must. Journal of the Science of Food and Agriculture 2020; 100: 2971-2981.

Albesa I, Becerra MC, Battán PC, Páez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004; 317: 605-609.

Api AM, Belsito D, Bhatia S, Botelho D, Browne D, Bruze M, et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, terpineol, CAS Registry Number 8000-41-7. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 2017; 110 Suppl 1: S392-S402.

Battin TJ, Kaplan LA, Findlay S, Hopkinson CS, Marti E, Packman AI, et al. Biophysical controls on organic carbon fluxes in fluvial networks. Nature Geoscience 2008; 1: 95-100.

Battistuzzi FU, Hedges SB. A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. Molecular Biology and Evolution 2009; 26; 335–343.

Beale DJ, Karpe AV, Ahmed W, Cook S, Morrison PD, Staley C, et al. A Community Multi-Omics Approach towards the Assessment of Surface Water Quality in an Urban River System. International Journal of Environmental Research and Public Health 2017; 14.

Belsito D, Bickers D, Bruze M, Calow P, Greim H, Hanifin JM, et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: S1-S71.

Brosche S, Backhaus T. Toxicity of five protein synthesis inhibiting antibiotics and their mixture to limnic bacterial communities. Aquatic Toxicology 2010; 99: 457-465.

Bubrick MP, Howard RJ, Pancorbo S, Lorber RR, Chin TWF, Yost R. A COMPARATIVE-STUDY OF NETILMICIN-CEFOXITIN AND GENTAMICIN-CEFOXITIN IN SURGICAL PATIENTS WITH SERIOUS SYSTEMIC INFECTION. Clinical Therapeutics 1983; 5: 515-524.

Burns JL, Smith AL. A MAJOR OUTER-MEMBRANE PROTEIN FUNCTIONS AS A PORIN IN HAEMOPHILUS-INFLUENZAE. Journal of General Microbiology 1987; 133: 1273-1277.

Calleja MC, Persoone G, Geladi P. COMPARATIVE ACUTE TOXICITY OF THE FIRST 50 MULTICENTER EVALUATION OF IN-VITRO CYTOTOXICITY

CHEMICALS TO AQUATIC NON-VERTEBRATES. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1994; 26: 69-78.
Carlotti B, Cesaretti A, Elisei F. Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques. Physical Chemistry Chemical Physics 2012; 14: 823-834.
Cedergreen N, Kamper A, Streibig JC. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. Aquatic Toxicology 2006; 78: 243-252.
Chang B-V, Ren Y-L. Biodegradation of three tetracyclines in river sediment. Ecological Engineering 2015; 75: 272-277.
Czech B, Josko I, Oleszczuk P. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to Vibrio fischeri and Daphnia magna before and after photooxidation process. Ecotoxicology and Environmental Safety 2014; 104: 247-253.
Choi K, Kim Y, Jung J, Kim M-H, Kim C-S, Kim N-H, et al. Occurrences and ecological risks of roxithromycin, trimethoprim, and chloramphenicol in the Han River, Korea. Environmental Toxicology and Chemistry 2008; 27: 711-719.
Choi S, Sim W, Jang D, Yoon Y, Ryu J, Oh J, et al. Antibiotics in coastal aquaculture waters: Occurrence and elimination efficiency in oxidative water treatment processes. Journal of Hazardous Materials 2020; 396.
Czech B, Josko I, Oleszczuk P. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to Vibrio fischeri and Daphnia magna before and after photooxidation process. Ecotoxicology and Environmental Safety 2014; 104: 247-253.
Consultants, I. A. L. 2018. Global overview of the flavours and fragrances market (11th ed.). London. Available on: https://www.marketresearch.com/IAL-Consultants-3050/Global-Overview-Flavours-Fragrances-11th-11788647/.
Dal AEB. Refining of Crude Sulfate Turpentine Obtained from a Kraft Pulp Mill: A Pilot Scale Treatment. Bioresources 2021; 16: 8098-8110.
Dang H, Ren J, Song L, Sun S, An L. Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China. World Journal of Microbiology & Biotechnology 2008; 24: 209-217.
Ding C, He J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Applied Microbiology and Biotechnology 2010; 87: 925-941.
Duran R, Bielen A, Paradzik T, Gassie C, Pustijanac E, Cagnon C, et al. Exploring Actinobacteria assemblages in coastal marine sediments under contrasted Human influences in the West Istria Sea, Croatia. Environmental Science and Pollution Research 2015; 22: 15215-15229.
Ericson AP, Matthews RF, Teixeira AA, Moye HA. RECOVERY OF GRAPEFRUIT OIL CONSTITUENTS FROM PROCESSING WASTE-WATER USING STYRENE-DIVINYLBENZENE RESINS. Journal of Food Science 1992; 57: 186-189.
Ferrando N, Pino-Otin MR, Terrado E, Ballestero D, Langa E. Bioactivity of Eugenol: A Potential Antibiotic Adjuvant with Minimal Ecotoxicological Impact. International Journal of Molecular Sciences 2024; 25.
Gonzalez-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, Leganes F, Rosal R, Boltes K, et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. Water Research 2013; 47: 2050-2064.
Gordon L, Giraud E, Ganiere JP, Armand F, Bouju-Albert A, de la Cotte N, et al. Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. Journal of Applied Microbiology 2007; 102: 1167-1176.
Gutmann L, Williamson R, Moreau N, Kitzis MD, Collatz E, Acar JF, et al. CROSS-RESISTANCE TO NALIDIXIC-ACID, TRIMETHOPRIM, AND CHLORAMPHENICOL ASSOCIATED WITH ALTERATIONS IN OUTER-MEMBRANE PROTEINS OF KLEBSIELLA, ENTEROBACTER, AND SERRATIA. Journal of Infectious Diseases 1985; 151: 501-507.
Hagenbuch IM, Pinckney JL. Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. Water Research 2012; 46: 5028-5036.
Havelkova B, Beklova M, Kovacova V, Hlavkova D, Pikula J. Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. Neuroendocrinology Letters 2016; 37: 38-44.
Hansch C , Leo A, Hoekman D. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society 1995; 177
Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H-C, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. Chemosphere 2008; 71: 1308-1316.
Hernando MD, Ejerhoon M, Fernández-Alba AR, Chisti Y. Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with Vibrio fischeri and Daphnia magna bioassays. Water Research 2003; 37: 4091-4098.
Hou A-m, Yang D, Miao J, Shi D-y, Yin J, Yang Z-w, et al. Chlorine injury enhances antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa through over expression of drug efflux pumps. Water Research 2019; 156: 366-371.
Huang J, Yang L, Zou Y, Luo S, Wang X, Liang Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of three isomeric terpineols ofCinnamomum longepaniculatumleaf oil. Folia Microbiologica 2021a; 66: 59-67.
Huang J, Yang L, Zou Y, Luo S, Wang X, Liang Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of three isomeric terpineols ofCinnamomum longepaniculatumleaf oil. Folia Microbiologica 2021b; 66: 59-67.
Huangfu Z, Khoso SA, Sun W, Hu Y, Chen C, Zhang Q. Utilization of petrochemical by-products as a new frother in flotation separation of molybdenum. Journal of Cleaner Production 2018; 204: 501-510.
Iavicoli I, Fontana L, Agathokleous E, Santocono C, Russo F, Vetrani I, et al. Hormetic dose responses induced by antibiotics in bacteria: A phantom menace to be thoroughly evaluated to address the environmental risk and tackle the antibiotic resistance phenomenon. Science of the Total Environment 2021; 798.
ISO 11348; Water Quality—Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of Aliivibrio fischeri (Luminescent Bacteria Test). International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
Jiang L, Hu X, Xu T, Zhang H, Sheng D, Yin D. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. Science of the Total Environment 2013; 458: 267-272.
Jie Y, Jinglin G, Zhaoguang Y, Haipu L, Bo Q. Degradation of α-terpineol in aqueous solution by UV/H2O2:

kinetics, transformation products and pathways. Water Science Technology 2019; 79: 2195–2202.
Jin D, Kong X, Cui B, Jin S, Xie Y, Wang X, et al. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. Scientific Reports 2018; 8.
JL G, AL M. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Applied and environmental microbiology 1991; 57.
Jurado A, Walther M, Silvia Diaz-Cruz M. Occurrence, fate and environmental risk assessment of the organic microcontaminants included in the Watch Lists set by EU Decisions 2015/495 and 2018/840 in the groundwater of Spain. Science of the Total Environment 2019; 663: 285-296.
Jüttner F. Efficacy of bank filtration for the removal of fragrance compounds and aromatic hydrocarbons. Water Science and Technology 1999; 40: 123-128.
Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in Bordetella bronchiseptica: identification of a novel chloramphenicol exporter. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007; 59: 191-196.
Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol 2017; 33: 300-305.
Khaleel C, Tabanca N, Buchbauer G. alpha-Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. Open Chemistry 2018; 16: 349-361.
Khleifat KM, Matar SA, Jaafreh M, Qaralleh H, Al-limoun MO, Alsharafa KY. Essential Oil of Centaurea damascena Aerial Parts, Antibacterial and Synergistic Effect. Journal of Essential Oil Bearing Plants 2019; 22: 356-367.
Kim HY, Asselman J, Jeong T-Y, Yu S, De Schamphelaere KAC, Kim SD. Multigenerational Effects of the Antibiotic Tetracycline on Transcriptional Responses of Daphnia magna and Its Relationship to Higher Levels of Biological Organizations. Environmental Science & Technology 2017; 51: 12898-12907.
Kim HY, Jeon J, Hollender J, Yu S, Kim SD. Aqueous and dietary bioaccumulation of antibiotic tetracycline in D. magna and its multigenerational transfer. Journal of Hazardous Materials 2014; 279: 428-435.
Klein EY, Milkowska-Shibata M, Tseng KK, Sharland M, Gandra S, Pulcini C, et al. Assessment of WHO antibiotic consumption and access targets in 76 countries, 2000-15: an analysis of pharmaceutical sales data. Lancet Infectious Diseases 2021; 21: 107-115.
Knox C, Wilson M, Klinger CM, et al. DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024. Available from: https://go.drugbank.com/drugs/DB15956
Knox C, Wilson M, Klinger CM, et al. DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024. Available from: https://go.drugbank.com/drugs/DB00798
Knox C, Wilson M, Klinger CM, et al. DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024. Available from: https://go.drugbank.com/drugs/DB00446
Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 SLC22A7). Journal of Pharmacy and Pharmacology 2005; 57: 573-578.
Kołodziejska M, Maszkowska J, Białk-Bielińska A. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. Chemosphere 2013; 92: 1253-1259
Kulik K, Lenart-Boron A, Wyrzykowska K. Impact of Antibiotic Pollution on the Bacterial Population within Surface Water with Special Focus on Mountain Rivers. Water 2023; 15.
Kungolos A, Hajispirou S, Petala M, Tsiridis V, Samaras P, Sakellaropoulos GP. Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on Daphnia magna and Vibrio fischeri. 6th International Conference on Protection and Restoration of the Environment, Skiathos Isl, Greece, 2002, pp. 817-823.
Lai H-T, Hou J-H, Su C-I, Chen C-L. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae Chlorella pyrenoidosa, Isochrysis galbana, and Tetraselmis chui. Ecotoxicology and Environmental Safety 2009; 72: 329-334.
Lei G, Mao P, He M, Wang L, Liu X, Zhang A. Combination of column adsorption and supercritical fluid extraction for recovery of dissolved essential oil from distillation waste water of Yulania liliiflora. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 2016; 91: 1896-1904.
Lesniak W, Pecoraro VL, Schacht J. Ternary complexes of gentamicin with iron and lipid catalyze formation of reactive oxygen species. Chemical Research in Toxicology 2005; 18: 357-364.
Lewis K, Ausubel FM. Prospects for plant-derived antibacterials. Nature Biotechnology 2006; 24: 1504-1507.
Li J, Perdue EM. Preprints of Papers Presented at the 209th ACS National Meeting, Anaheim, CA 1995; 35: 134-7.
Li L, Shi C, Yin Z, Jia R, Peng L, Kang S, et al. Antibacterial activity of α-terpineol may induce morphostructural alterations in Escherichia coli. Brazilian Journal of Microbiology 2014; 45: 1409-1413.
Li S, Shi W, Liu W, Li H, Zhang W, Hu J, et al. A duodecennial national synthesis of antibiotics in China's major rivers and seas (2005-2016). Science of the Total Environment 2018a; 615: 906-917.
Li W, Li Y, Jiang X, Li X, Yu Z. Compound Ammonium Glycyrrhizin Protects Hepatocytes from Injury Induced by Lipopolysaccharide/Florfenicol through a Mitochondrial Pathway. Molecules 2018b; 23.
Liao Q, Rong H, Zhao M, Luo H, Chu Z, Wang R. Interaction between tetracycline and microorganisms during wastewater treatment: A review. Science of the Total Environment 2021; 757.
Liu X, Lv K, Deng C, Yu Z, Shi J, Johnson AC. Persistence and migration of tetracycline, sulfonamide, fluoroquinolone, and macrolide antibiotics in streams using a simulated hydrodynamic system. Environmental Pollution 2019; 252: 1532-1538.
Liu Y, Guo R, Tang S, Zhu F, Zhang S, Yan Z, et al. Single and mixture toxicities of BDE-47, 6-OH-BDE-47 and 6-MeO-BDE-47 on the feeding activity of Daphnia magna: From behavior assessment to neurotoxicity. Chemosphere 2018; 195: 542-550.
Lomba L, Lapena D, Ros N, Aso E, Cannavo M, Errazquin D, et al. Ecotoxicological study of six drugs in Aliivibrio fischeri, Daphnia magna and Raphidocelis subcapitata. Environmental Science and Pollution Research 2020; 27: 9891-9900.
Lorenzo P, Adriana A, Jessica S, Caries B, Marinella F, Marta L, et al. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. Chemosphere 2018; 206: 70-82.
Lund ED, Bryan WL. COMPOSITION OF LEMON OIL DISTILLED FROM COMMERCIAL MILL WASTE. Journal of Food Science 1976; 41: 1194-1197.
Löffler D, Ternes TA. Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography electrospray-

tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 2003; 1000: 583-588.
Madigan TM, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Brock S. Biología de los microorganismos 2015. Pearson Educacion, Madrid, ISBN 978-84-9035- 279-3 (14a edicion).
Marnett LJ, Cohen SM, Fukushima S, Gooderham NJ, Hecht SS, Rietjens IMCM, et al. GRASr2 Evaluation of Aliphatic Acyclic and Alicyclic Terpenoid Tertiary Alcohols and Structurally Related Substances Used as Flavoring Ingredients. Journal of Food Science 2014; 79: R428-R441.
Martins A, Guimaraes L, Guilhermino L. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to Daphnia magna assessed at two temperatures. Environmental Toxicology and Pharmacology 2013a; 36: 1022-1032.
Martins M, McCusker MP, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pages J-M, et al. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. The open microbiology journal 2013b; 7: 72-82.
Menz J, Baginska E, Arrhenius A, Haiss A, Backhaus T, Kuemmerer K. Antimicrobial activity of pharmaceutical cocktails in sewage treatment plant effluent - An experimental and predictive approach to mixture risk assessment. Environmental Pollution 2017; 231: 1507-1517.
Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999; 43: 727-737.
Mitchell RF, Ray AM, Hanks LM, Millar JG. The Common Natural Products (S)-α-Terpineol and (E)-2-Hexenol are Important Pheromone Components of Megacyllene antennata (Coleoptera: Cerambycidae). Environmental Entomology 2018; 47: 1547-1552.
Mitchell SM, Ullman JL, Teel AL, Watts RJ. Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin. Chemosphere 2015; 134: 504-511.
Morris AR, Visick KL. The response regulator SypE controls biofilm formation and colonization through phosphorylation of the syp-encoded regulator SypA in Vibrio fischeri. Molecular Microbiology 2013; 87: 509-525.
MR P-O, S M, J V, E N. Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. The Science of the total environment 2017; 595.
Munch Christensen A, Ingerslev F, Baun A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. Environmental Toxicology and Chemistry 2006; 25: 2208-2215.
Narciso-da-Rocha C, Manaia CM. Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. Science of the Total Environment 2016; 563: 1-9.
Negreiros HA, Fontele SBC, Batista FA, Farias MGd, Silva FCCd, Nascimento MLLBd, et al. Toxicogenetic profile of the monoterpene alpha-terpineol on normal and tumor eukaryotic cells. Drug and Chemical Toxicology: 1-9.
Ng K, Alygizakis NA, Thomaidis NS, Slobodnik J. Wide-Scope Target and Suspect Screening of Antibiotics in Effluent Wastewater from Wastewater Treatment Plants in Europe. Antibiotics-Basel 2023; 12.
Oliveira I, Roberta J, Oliveira A, Guedes A, et al. Biological properties of terpinolene evidenced by in silico, in vitro and in vivo studies: A systematic review. Phytomedicine 2023; 93.
O'Neil, M.J. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Royal Society of Chemistry 2013; 367
O'Sullivan LA, Rinna J, Humphreys G, Weightman AJ, Fry JC. Culturable phylogenetic diversity of the phylum 'Bacteroidetes' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family Flavobacteriaceae: Epilithonimonas tenax gen. nov., sp nov and Persicivirga xylanidelens gen. nov., sp nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2006; 56: 169-180.
Orchard S, Holdway D, Barata C, Van Dam R. A rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical cladoceran Moinodaphnia macleayi. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 2002; 53: 12-19.
Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2; OECD: Paris, France, 2004.
Ortega C, Gimeno O, Blanc V, Cortes P, Ania S, Llagostera M. Antibiotic susceptibility of strains of Aeromonas salmonicida isolated from spanish salmonids. Revue De Medecine Veterinaire 2006; 157: 410-414.
Oyedemi SO, Okoh AI, Mabinya LV, Pirochenva G, Afolayan AJ. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α-terpineol and γ-terpinene against Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris and Escherichia coli. African Journal of Biotechnology 2009; 8: 1280-1286.
Park S, Choi K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. ECOTOXICOLOGY 2008; 17: 526-538.
Pharmacompass 2024. Available on:https://www.pharmacompass.com/activepharmaceutical-ingredients/alpha-terpineol.
Pino-Otin MR, Langa E, Val J, Mainar AM, Ballestero D. Impact of citronellol on river and soil environments using non-target model organisms and natural populations. Journal of Environmental Management 2021; 287.
Pino-Otin MR, Lorca G, Langa E, Roig F, Terrado EM, Ballestero D. Assessing the Ecotoxicity of Eight Widely Used Antibiotics on River Microbial Communities. International Journal of Molecular Sciences 2023a; 24.
Pino-Otin MR, Lorca G, Val J, Ferrando N, Ballestero D, Langa E. Ecotoxicological Study of Tannic Acid on Soil and Water Non-Target Indicators and Its Impact on Fluvial and Edaphic Communities. Plants-Basel 2023b; 12.
Pino-Otin MR, Valenzuela A, Gan C, Lorca G, Ferrando N, Langa E, et al. Ecotoxicity of five veterinary antibiotics on indicator organisms and water and soil communities. Ecotoxicology and environmental safety 2024; 274: 116185-116185.
Pino-Otín M, Lorca G, Langa E, Roig F, Terrado E, Ballestero D. Assessing the Ecotoxicity of Eight Widely Used Antibiotics on River Microbial Communities. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2023; 24.
Pino-Otín M, Valenzuela A, Gan C, Lorca G, Ferrando N, Langa E, et al. Ecotoxicity of five veterinary antibiotics on indicator organisms and water and soil communities. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 2024; 274.
Pino-Otín MR, Ballestero D, Navarro E, González-Coloma A, Val J, Mainar AM. Ecotoxicity of a novel biopesticide from Artemisia absinthium on non-target aquatic organisms. Chemosphere 2019; 216: 131-146.

Pohland B, Owen, B. TAS. technical bulletin Biolog. 2009: 1 pp. 1–3.
Proia L, Lupini G, Osorio V, Perez S, Barcelo D, Schwartz T, et al. Response of biofilm bacterial communities to antibiotic pollutants in a Mediterranean river. Chemosphere 2013; 92: 1126-1135.
Qian M, Wang J, Ji X, Yang H, Tang B, Zhang H, et al. Sub-chronic exposure to antibiotics doxycycline, oxytetracycline or florfenicol impacts gut barrier and induces gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish (Daino rerio). ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 2021; 221.
Rapoport N, Smirnov AI, Pitt WG, Timoshin EA. Bioreduction of tempone and spin-labeled gentamicin by gram-negative bacteria: Kinetics and effect of ultrasound. Archives of Biochemistry and Biophysics 1999; 362: 233-241.
Rathborey C, Sirinthrar W, Manna W, Wilai C, Chart C, Chihiro Y .Fate, transport and ecological risk of antibiotics from pig farms along the bang pakong River, Thailand. Agriculture, Ecosystems & Environment 2020; 304
Ratul B, Shubham R, Sounok S, Lokesh R. Computer aided drug design of florfenicol to target chloramphenicol acetyltransferase of vibriosis causing pathogens. Journal of Applied Biology & Biotechnology 2022.
Rider CV, LeBlanc GA. An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures. Toxicological Sciences 2005; 87: 520-528.
Roberts MC, Schwarz S. Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. Journal of Environmental Quality 2016; 45: 576-592.
Rosal R, Rodea-Palomares I, Boltes K, Fernandez-Pinas F, Leganes F, Petre A. Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. Chemosphere 2010; 81: 288-293.
Sales A, Felipe LdO, Bicas JL. Production, Properties, and Applications of alpha-Terpineol. Food and Bioprocess Technology 2020; 13: 1261-1279.
Sandoval R, Oliver C, Valdivia S, Valenzuela K, Haro RE, Sanchez P, et al. Resistance-nodulation-division efflux pump acrAB is modulated by florfenicol and contributes to drug resistance in the fish pathogen Piscirickettsia salmonis. Fems Microbiology Letters 2016; 363.
Settimo L, Bellman K, Knegtel RM. Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds. Pharmaceutical research 2014; 31: 1082-1095.
Sharifi-Rad J, Salehi B, Varoni EM, Sharopov F, Yousaf Z, Ayatollahi SA, et al. Plants of the Melaleuca Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. Phytotherapy Research 2017; 31: 1475-1494.
Sigma-Aldrich safety data sheet. Available on: https://www.sigmaaldrich.com/ES/en/sds/aldrich/w304506?userType=undefined
Sigurnjak M, Cvetnić M, Miloloža M, et al. Modeling the toxicity of pollutants mixtures for risk assessment: a review. Environmental Chemistry Letters 2021; 19: 1629–1655.
Sikder S, Toha M, Anik AH, Sultan MB, Alam M, Parvin F, et al. A comprehensive review on the fate and impact of antibiotic residues in the environment and public health: A special focus on the developing countries. Water Environment Research 2024; 96.
Sikkema J, Debont JAM, Poolman B. INTERACTIONS OF CYCLIC HYDROCARBONS WITH BIOLOGICAL-MEMBRANES. Journal of Biological Chemistry 1994; 269: 8022-8028.
Simonich SL, Begley WM, Debaere G, Eckhoff WS. Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater. Environmental Science & Technology 2000; 34: 959-965.
Simonich SL, Federle TW, Eckhoff WS, Rottiers A, Webb S, Sabaliunas D, et al. Removal of fragrance materials during US and European wastewater treatment. Environmental Science & Technology 2002; 36: 2839-2847.
Singh R, Singh AP, Kumar S, Giri BS, Kim K-H. Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. Journal of Cleaner Production 2019; 234: 1484-1505.
Skrbic BD, Kadokami K, Antic I. Survey on the micro-pollutants presence in surface water system of northern Serbia and environmental and health risk assessment. Environmental Research 2018; 166: 130-140.
Song C, Zhang C, Fan L, Qiu L, Wu W, Meng S, et al. Occurrence of antibiotics and their impacts to primary productivity in fishponds around Tai Lake, China. Chemosphere 2016; 161: 127-135.
Srain HS, Beazley KF, Walker TR. Pharmaceuticals and personal care products and their sublethal and lethal effects in aquatic organisms. Environmental Reviews 2021; 29: 142-181.
Staley C, Gould TJ, Wang P, Phillips J, Cotner JB, Sadowsky MJ. Species sorting and seasonal dynamics primarily shape bacterial communities in the Upper Mississippi River. Science of the Total Environment 2015; 505: 435-445.
Stoll C, Sidhu JPS, Tiehm A, Toze S. Prevalence of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Surface Water Samples Collected from Germany and Australia. Environmental Science & Technology 2012; 46: 9716-9726.
Stroh J, Wan MT, Isman MB, Moul DJ. Evaluation of the Acute Toxicity to Juvenile Pacific Coho Salmon and Rainbow Trout of Some Plant Essential Oils, a Formulated Product, and the Carrier. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 1998; 60: 923-930.
Tahrani L, Van Loco J, Ben Mansour H, Reyns T. Occurrence of antibiotics in pharmaceutical industrial wastewater, wastewater treatment plant and sea waters in Tunisia. Journal of Water and Health 2016; 14: 208-213.
Tkaczyk A, Bownik A, Dudka J, Kowal K, Slaska B. Daphnia magna model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. Science of the Total Environment 2021; 763.
Tosun MN, Taylan G, Zorba NND. Antibacterial and antibiofilm activities of some plant essential oils and synergistic effects of cinnamon essential oil with vancomycin against Clostridioides difficile: in vitro study. Letters in Applied Microbiology 2022; 75: 598-606.
Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005; 49: 2474-2478.
Uddin GMN, Larsen MH, Barco L, Tran Minh P, Dalsgaard A. Clonal Occurrence of Salmonella Weltevreden in Cultured Shrimp in the Mekong Delta, Vietnam. Plos One 2015; 10.
UNE-EN ISO 6341; Water Quality—Determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera Crustacea)—Acute Toxicity Test. AENOR: Madrid, Spain, 2012.
US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Nov, 2012. Available from: https://www2.epa.gov/tsca-screening-tools

Valenzuela A, Ballestero D, Gan C, Lorca G, Langa E, Pino-Otin MR. Hydroquinone Ecotoxicity: Unveiling Risks in Soil and River Ecosystems with Insights into Microbial Resilience. Toxics 2024; 12.

Villa S, Vighi M, Finizio A. Experimental and predicted acute toxicity of antibacterial compounds and their mixtures using the luminescent bacterium Vibrio fischeri. Chemosphere 2014; 108: 239-244.

Wang J, Cooper DL, Zhan W, Wu D, He H, Sun S, et al. Diglycine Enables Rapid Intrabacterial Hydrolysis for Activating Anbiotics against Gram-negative Bacteria. Angewandte Chemie-International Edition 2019; 58: 10631-10634.

Wang X, Gu J, Gao H, Qian X, Li H. Abundances of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Diversity in the Weihe River, China. International Journal of Environmental Research and Public Health 2018; 15.

Wiart C, Kathirvalu G, Raju CS, Nissapatorn V, Rahmatullah M, Paul AK, et al. Antibacterial and Antifungal Terpenes from the Medicinal Angiosperms of Asia and the Pacific: Haystacks and Gold Needles. Molecules 2023; 28.

Wollenberger L, Halling-Sorensen B, Kusk KO. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna. Chemosphere 2000; 40: 723-730

World Health O. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Seventy-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization technical report series 2014: 1-cover.

Yang T-S, Chao LK-P, Liu T-T. Antimicrobial activity of the essential oil of Glossogyne tenuifolia against selected pathogens. Journal of the Science of Food and Agriculture 2014; 94: 2965-2971.

Yao J, Guo J, Yang Z, Li H, Qiu B. Degradation of α-terpineol in aqueous solution by UV/H₂O₂: kinetics, transformation products and pathways. Water Science and Technology 2019; 79: 2195-2202.

Yin K, Deng L, Luo J, Crittenden J, Liu C, Wei Y, et al. Destruction of phenicol antibiotics using the UV/H₂O₂ process: Kinetics, byproducts, toxicity evaluation and trichloromethane formation potential. Chemical Engineering Journal 2018; 351: 867-877.

Zhang B, Wu X, Tai X, Sun L, Wu M, Zhang W, et al. Variation in Actinobacterial Community Composition and Potential Function in Different Soil Ecosystems Belonging to the Arid Heihe River Basin of Northwest China. Frontiers in Microbiology 2019a; 10.

Zhang F, Mao X, Song X, Yu H, et al. Ecological Risks of Antibiotics in Urban Wetlands on the Qinghai-Tibet Plateau, China. International Journal of Environmental Research and Public Health 2023, 20:1735-1735.

Zhang G, Sun K, Ai G, Li J, Tang N, Song Y, et al. A novel family of intrinsic chloramphenicol acetyltransferase CATC in Vibrio parahaemolyticus : Naturally occurring variants reveal diverse resistance levels against chloramphenicol. International Journal of Antimicrobial Agents 2019b; 54: 75-79.

Zhang L, Du S, Zhang X, Lyu G, Dong D, Hua X, et al. Occurrence, distribution, and ecological risk of pharmaceuticals in a seasonally ice-sealed river: From ice formation to melting. Journal of Hazardous Materials 2020a; 389.

Zhang L, Fang W, Li X, Lu W, Li J. Strong linkages between dissolved organic matter and the aquatic bacterial community in an urban river. Water Research 2020b; 184.

Zhang P, Yan Z, Lu G, Ji Y. Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on Daphnia magna. Environmental Science and Pollution Research 2019c; 26: 17010-17020.

Zhang T, Ding Y, Peng J, Dai Y, Luo S, Liu W, et al. Effects of Broad-Spectrum Antibiotic (Florfenicol) on Resistance Genes and Bacterial Community Structure of Water and Sediments in an Aquatic Microcosm Model. Antibiotics-Basel 2022; 11.

Zhang T, Peng J, Dai Y, Xie X, Luo S, Ding Y, et al. Effect of florfenicol on nirS-type denitrifying communities structure of water in an aquatic microcosm model. FRONTIERS IN VETERINARY SCIENCE 2023; 10.

Zhang W, Sun W, An S, Xiong B, Lin K, Cui X, et al. Acute and Chronic Toxic Effects of Chloramphenicol on Scenedesmus Obliquus and Chlorella Pyrenoidosa. WATER ENVIRONMENT RESEARCH 2013; 85: 725-732.

Zhang X, Song Y, Xinxin C, Na A, Junwen F, Junqing C, Xuming D. Effects of florfenicol on early cytokine responses and survival in murine endotoxemia. International Immunopharmacology 2008; 8:982-988.

Zhang Y, Guo P, Wang M, Wu Y, Sun Y, Su H, et al. Mixture toxicity effects of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol in Daphnia magna under different temperatures. Ecotoxicology 2021a; 30: 31-42.

Zhang Y, Guo P, Wu Y, Wang M, Deng J, Su H, et al. Evaluation of the Acute Effects and Oxidative Stress Responses of Phenicol Antibiotics and Suspended Particles in Daphnia magna. Environmental Toxicology and Chemistry 2021b; 40: 2463-2473.

Zhang Y, Guo P, Wu Y, Zhang X, Wang M, Yang S, et al. Evaluation of the subtle effects and oxidative stress response of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in Daphnia magna. Environmental Toxicology and Chemistry 2019d; 38: 575-584.

Zhou H, Tao N, Jia L. Antifungal activity of citral, octanal and α-terpineol against Geotrichum citri-aurantii. Food Control 2014; 37: 277-283.

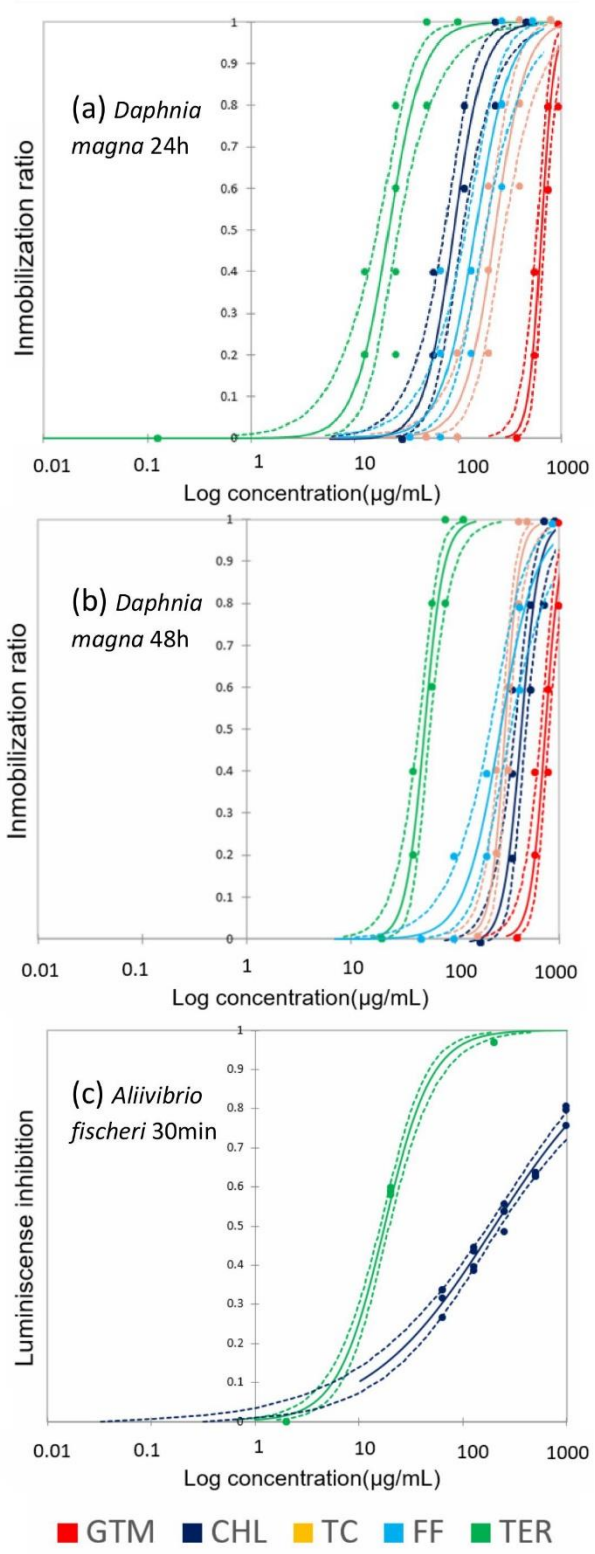


Figure 1: Dose-response curve for *Daphnia magna* after 24h (a) and 48h (b) of exposure and for *Aliivibrio fischeri* after 30 min (c) of exposure to Gentamycin (GTM), Chloramphenicol (CHL), Tetracycline (TC), Florfenicol (FF) and Terpineol (TER). The solid line represents the mean of the experimental values (dots), while the dashed lines indicate the 95% confidence interval. In the case of *Aliivibrio fischeri*, TC was excluded from plotting due to methodological incompatibility, while GTM and FF were omitted because their LC_{50} values fell outside the range assessed in this study.

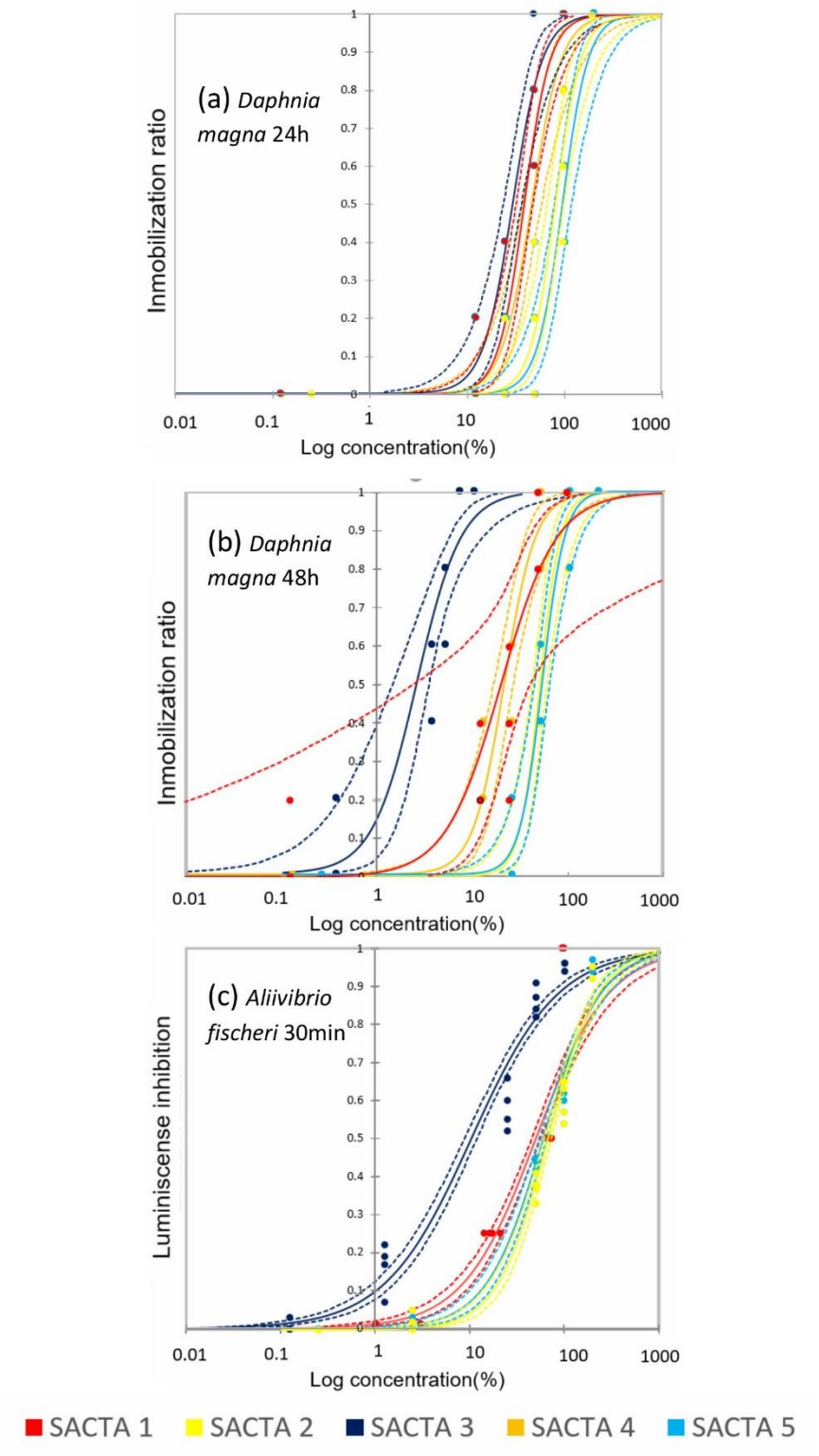


Figure 2: Dose-response curve for *Daphnia magna* after 24h (a) and 48h (b) and for *Aliivibrio fischeri* after 30 min (c) of exposure to SACTA 1 (Terpineol 125 µg/mL + Gentamycin 3.9 µg/mL), SACTA 2 (Terpineol 62.5 µg/mL + Gentamycin 3.9 µg/mL), SACTA 3 (Terpineol 125 µg/mL + Chloramphenicol 15.6 µg/mL), SACTA 4 (Terpineol 125 µg/mL + Tetracycline 15.6 µg/mL), SACTA 5 (Terpineol 62.5 µg/mL + Florfenicol 7.8 µg/mL). The solid line represents the mean of the experimental values (dots), while the dashed lines indicate the 95% confidence interval.

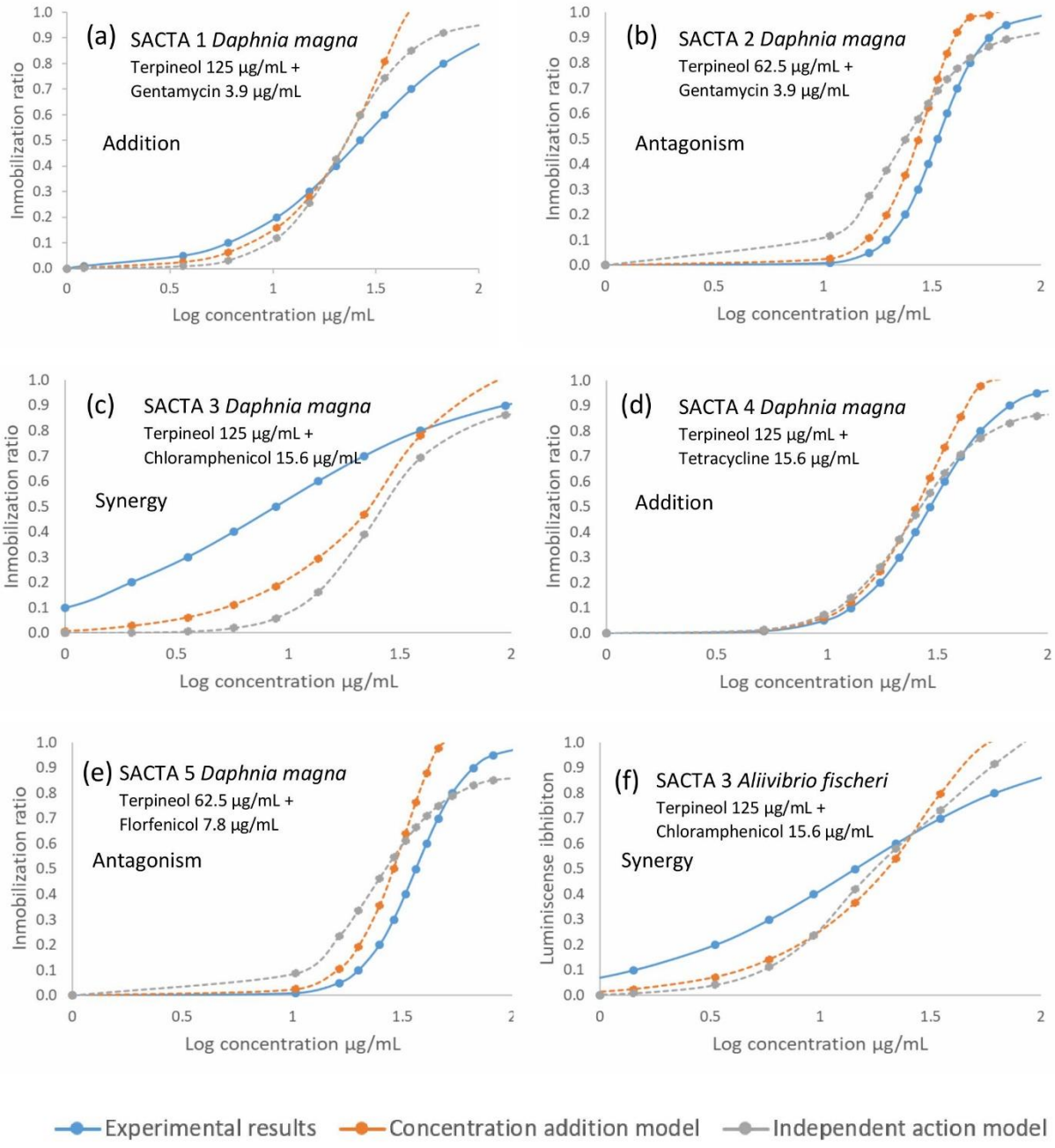


Figure 3: Comparison of experimental results and predictions of dose-response curve for *Daphnia magna* after 48h of exposure to SACTA 1 (Terpineol 125 µg/mL + Gentamycin 3.9 µg/mL) (a), SACTA 2 (Terpineol 62.5 µg/mL + Gentamycin 3.9 µg/mL) (b), SACTA 3 (Terpineol 125 µg/mL + Chloramphenicol 15.6 µg/mL) (c), SACTA 4 (Terpineol 125 µg/mL + Tetracycline 15.6 µg/mL) (d) and SACTA 5 (Terpineol 62.5 µg/mL + Florfenicol 7.8 µg/mL) (e) and for *Aliivibrio fischeri* after 30 min of exposure to SACTA 3 (Terpineol 125 µg/mL + Chloramphenicol 15.6 µg/mL) (f). The solid line represents the experimental results, while the dashed lines indicate the predicted models.

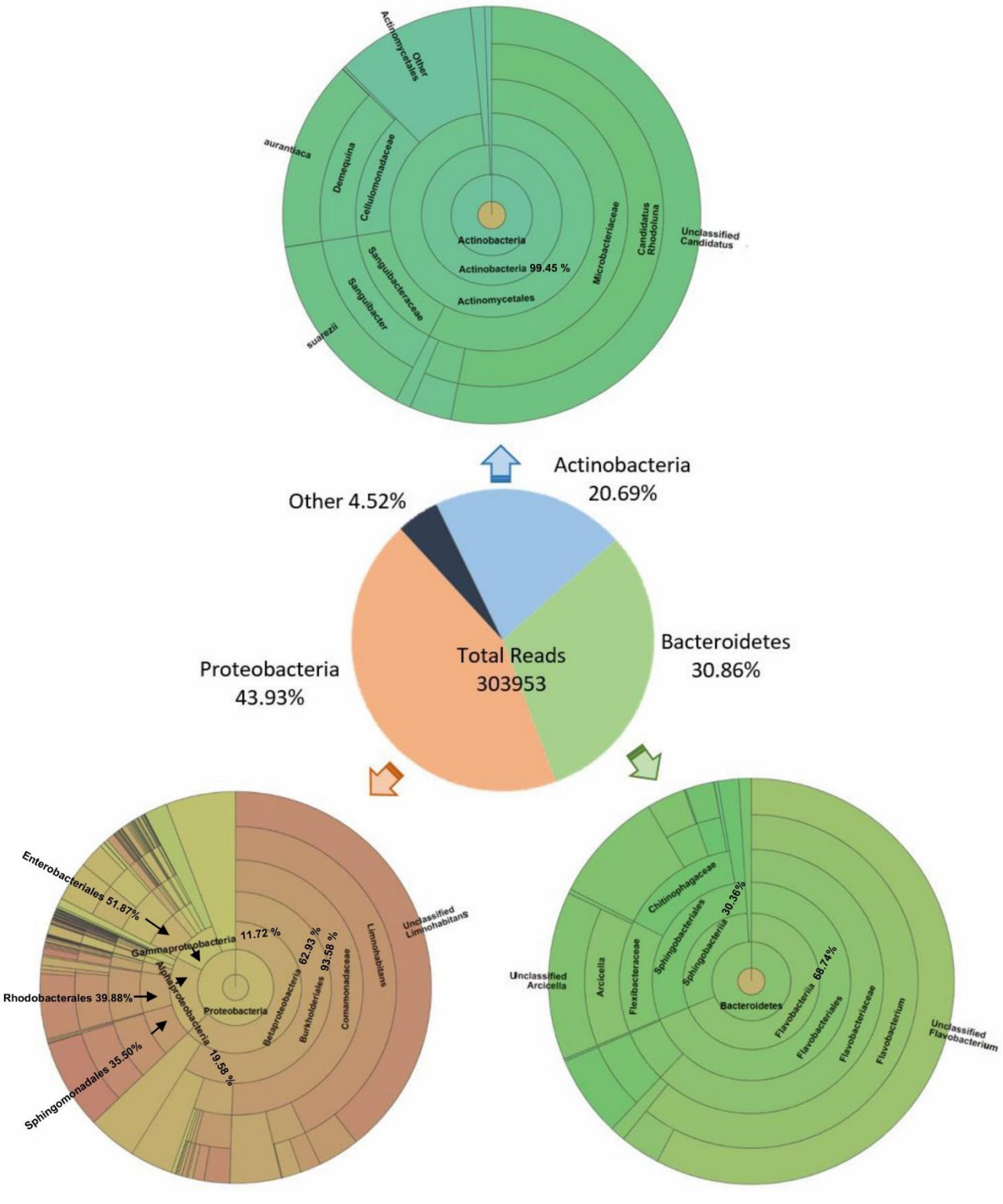
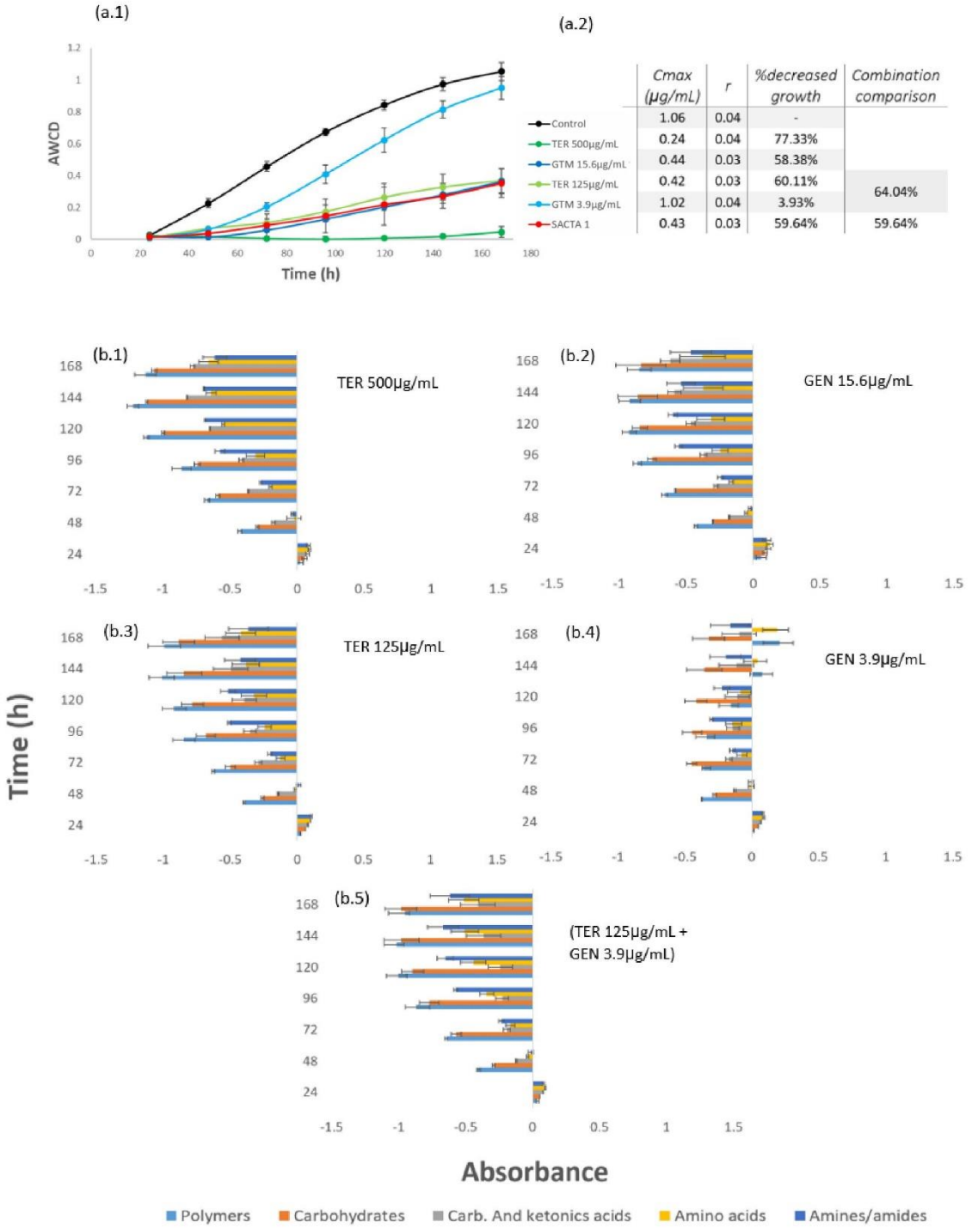


Figure 4: Depiction of the most dominant phyla identified in the river, showing the proportion of genetically sequenced microorganisms categorized by their taxonomic ranks at various levels.



	Cmax (µg/mL)	r	%decreased growth	Combination comparison
Control	1.06	0.04	-	
TER 500µg/mL	0.24	0.04	77.33%	
GTM 15.6µg/mL	0.44	0.03	58.38%	
TER 125µg/mL	0.42	0.03	60.11%	64.04%
GTM 3.9µg/mL	1.02	0.04	3.93%	
SACTA 1	0.43	0.03	59.64%	59.64%

Figure 5: AWCD values (a.1), Cmax, r, % of decreased growth (a.2) and metabolic effect differentiation by carbon sources (b.1-b.5) in Biolog EcoPlates based on 168h incubation of river microorganisms exposed to TER and GTN at MIC and synergy concentrations of SACTA 1. Each point is the average of three replicates. Cmax and r values were determined using the Excel Solver add-in (Microsoft 365). Growth reduction was calculated by comparing the compound's Cmax to that of the control

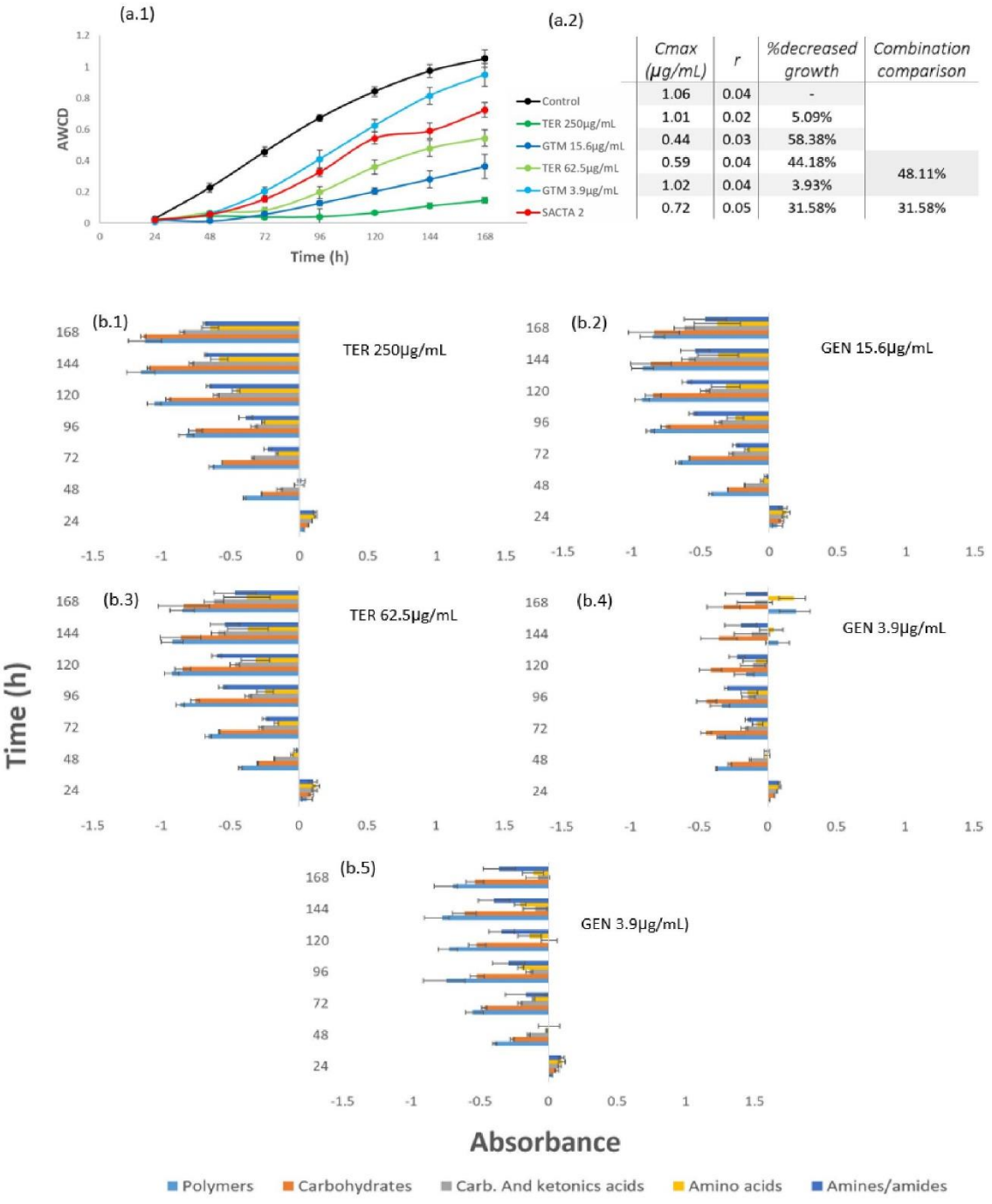


Figure 6: AWCD values (a.1), Cmax, r, % of decreased growth (a.2) and metabolic effect differentiation by carbon sources (b.1-b.5) in Biolog EcoPlates based on 168h incubation of river microorganisms exposed to TER and GEN at MIC and synergy concentrations of SACTA 2. Each point is the average of three replicates. Cmax and r values were determined using the Excel Solver add-in (Microsoft 365). Growth reduction was calculated by comparing the compound's Cmax to that of the control.

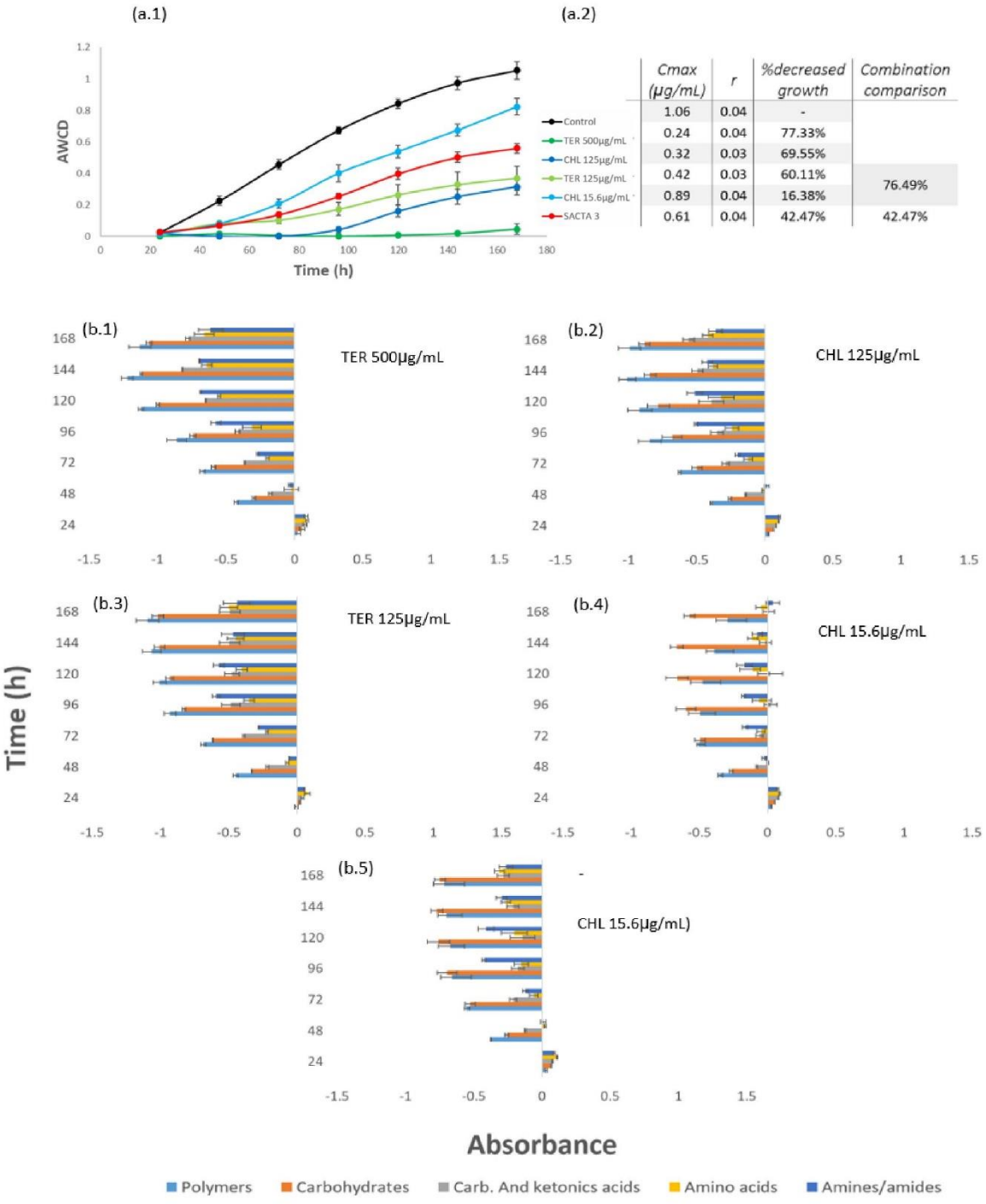


Figure 7: AWCD values (a.1), Cmax, r, % of decreased growth (a.2) and metabolic effect differentiation by carbon sources (b.1-b.5) in Biolog EcoPlates based on 168h incubation of river microorganisms exposed to TER and CHL at MIC and synergy concentrations of SACTA 3. Each point is the average of three replicates. Cmax and r values were determined using the Excel Solver add-in (Microsoft 365). Growth reduction was calculated by comparing the compound's Cmax to that of the control.

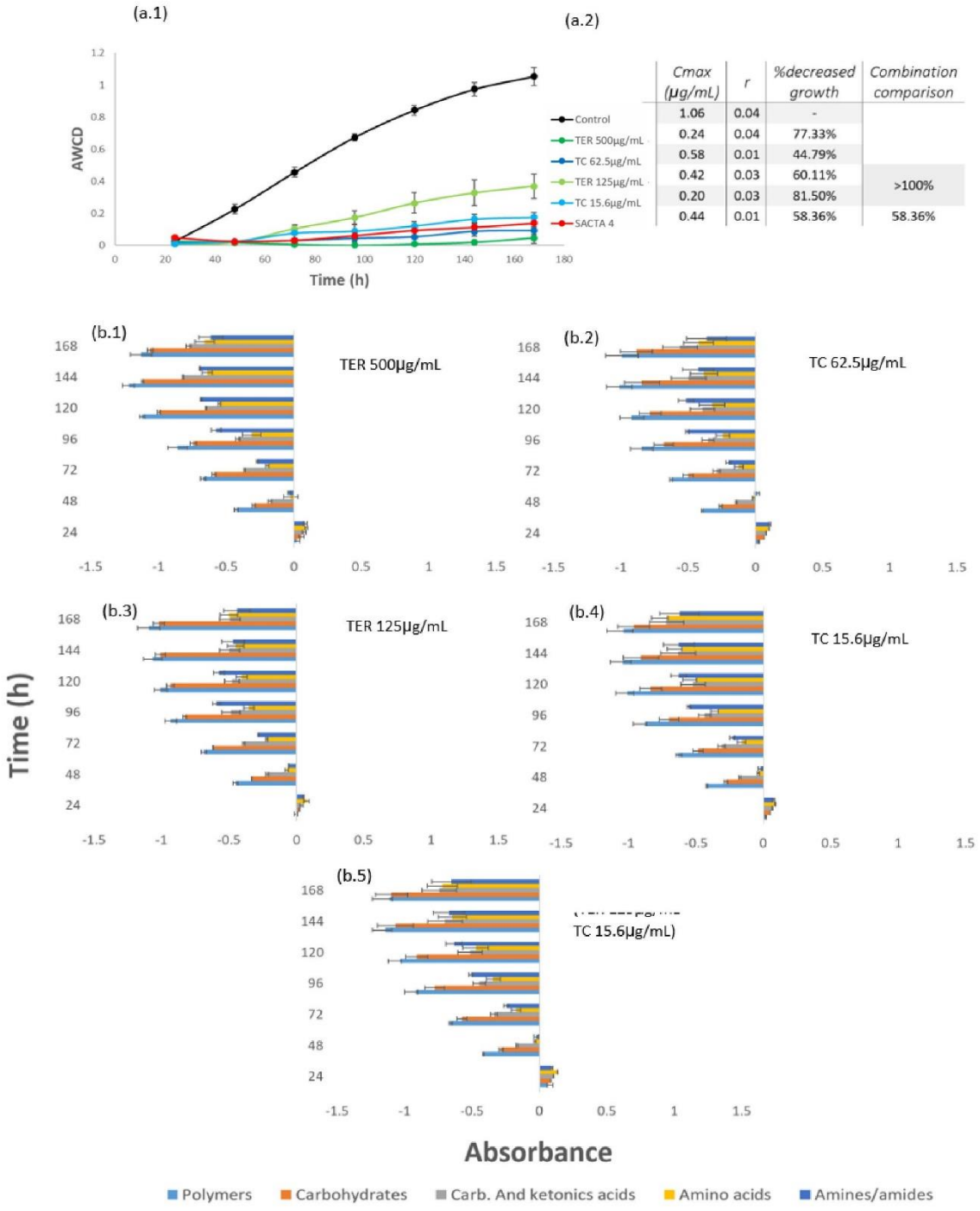
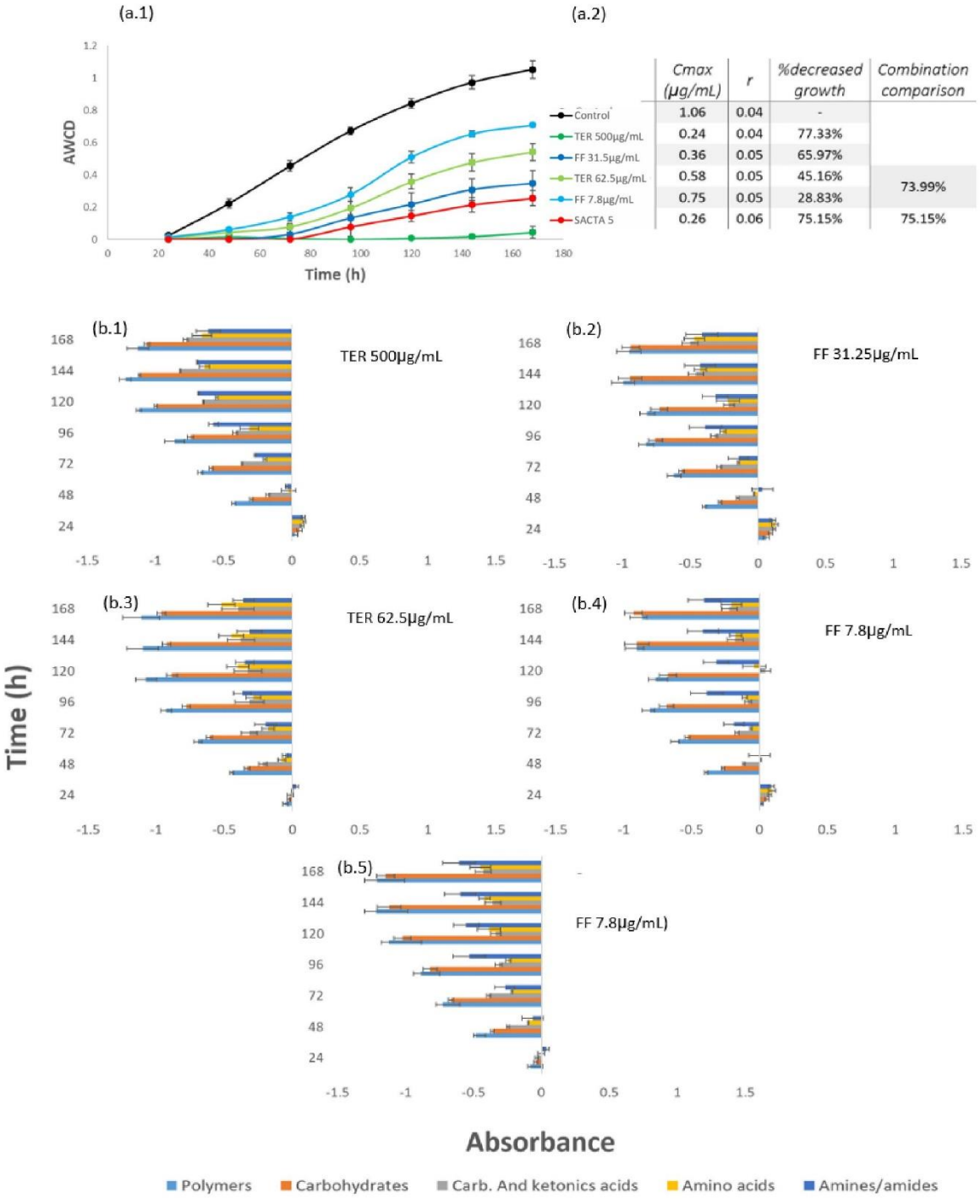


Figure 8: AWCD values (a.1), Cmax, r, % of decreased growth (a.2) and metabolic effect differentiation by carbon sources (b.1-b.5) in Biolog EcoPlates based on 168h incubation of river microorganisms exposed to TER and TC at MIC and synergy concentrations of SACTA 4. Each point is the average of three replicates. Cmax and r values were determined using the Excel Solver add-in (Microsoft 365). Growth reduction was calculated by comparing the compound's Cmax to that of the control.



	Cmax (µg/mL)	r	%decreased growth	Combination comparison
Control	1.06	0.04	-	
TER 500µg/mL	0.24	0.04	77.33%	
FF 31.5µg/mL	0.36	0.05	65.97%	
TER 62.5µg/mL	0.58	0.05	45.16%	73.99%
FF 7.8µg/mL	0.75	0.05	28.83%	
SACTA 5	0.26	0.06	75.15%	75.15%

Figure 9: AWCD values (a.1), Cmax, r, % of decreased growth (a.2) and metabolic effect differentiation by carbon sources (b.1-b.5) in Biolog EcoPlates based on 168h incubation of river microorganisms exposed to TER and FF at MIC and synergy concentrations of SACTA 5. Each point is the average of three replicates. Cmax and r values were determined using the Excel Solver add-in (Microsoft 365). Growth reduction was calculated by comparing the compound's Cmax to that of the control.

Table 1. Properties of TER and ABXs studied and the SACTA resulted.

Compound	Abbreviation	CAS number	Molecular weight (g/mol)	Family	Supplier	Purity	Water solubility (mg/mL)	pKa1/pKa2	Log Ko/w
Terpineol	TER	8000-41-7	154.3	Terpenes	Sigma-Aldrich	≤100%	2.54[1]	19.4/-0.87[2]	2.98[3]
Gentamycin	GTM	1403-66-3	447.6	Aminoglycosides	Acofarma	≥97%	12.6[4]	12.6/10.1[4]	-1.88[5]
Tetracycline	TC	64-75-5	444.4	Tetracyclines	Acofarma	99.2%	2.31[6]	7.68/3.3[6]	1.37[7]
Chloramphenicol	CHL	56-75-7	323.1	Amphenicols	Acofarma	97.5%	2.5[8]	8.7/-2.8[9]	1.14[7]
Florfenicol	FF	73231-34-2	358.2		Laboratorios Karizoo, S.A.	-	9.94[10]	10.73[11]	-0.04[10]

Number of SACTA[b]	SACTA[a] (µg/mL)	Concentration of Terpineol in SACTA (µg/mL)	Concentration of Antibiotic in SACTA (µg/mL)	MIC of Terpineol alone (µg/mL)	MIC of Antibiotic alone (µg/mL)	Bacterium	Terpineol reduction (%)	Antibiotic reduction (%)
1	Terpineol 125 + Gentamycin 3.9	125	3.9	500	15.6	*S. aureus* and *S. agalactiae*	75.0	75.0
2	Terpineol 62.5 + Gentamycin 3.9	62.5	3.9	250	15.6	*A. baumannii*	75.0	75.0
3	Terpineol 125 + Chloramphenicol 15.6	125	15.6	500	125	*S. marcescens*	75.0	87.5
4	Terpineol 125 + Tetracycline 15.6	125	15.6	500	62.5	*S. marcescens*	75.0	75.0
5	Terpineol 62.5 + Florfenicol 7.8	62.5	7.8	500	31.25	*S. aureus*	87.5	75.0

[a] *SACTA: Synergistic Antimicrobial Combinations of Terpineol and Antibiotics*

[1] (SigmaAldrich,2024)
[2] (Drugbank,2024a)
[3] (Li J et al.,1995)
[4] (Drugbank,2024b)
[5] (US EPA,2012)
[6] (Drugbank,2024c)
[7] (Hansch C et al.,1995)
[8] (0´Neil, 2013)
[9] (Drugbank,2024d)
[10] (Rathborey Chan et al., 2020)
[11] (Settimo L et al., 2014)

Table 2: Ecotoxicology of studied synergies on river bioindicators.

	Compound	LC_{50} *Daphnia magna* 24h µg/mL (IC 95%)		LC_{50} *Daphnia magna* 48h µg/mL (IC 95%)			LC_{50} *Aliivibrio fischeri* 30min µg/mL (IC 95%)		
	Terpineol alone	51.228 (44.661-57.488)		21.493 (16.708-26.695)			17.654 (15.946-19.493)		
	Gentamycin alone	840.75 (742.70-927.24) [1]		687.04 (626.07-743.50)			>1000 [2]		
	Chloramphenicol alone	285.63 (235.12-333.92)[3]		157.04 (127.75-191.51) [4]			197.25 (171.57-225.51)[5]		
	Tetracycline alone	391.07 (352.71-430.33)		232.93 (189.94-285.95)[6]			-*		
	Florfenicol alone	326.40 (263.50-406.30)		220.14 (176.79-274.02)[7]			>1000[8]		
Nº SACTA[a]	**SACTA[a] (µg/mL)**	**LC_{50} *Daphnia magna* 24h % (IC 95%)**	**LC_{50} *Daphnia magna* 24h µg/mL (IC 95%)**	**LC_{50} *Daphnia magna* 48h % (IC 95%)**	**LC_{50} *Daphnia magna* 48h µg/mL (IC 95%)**	**Toxicity effect**	**LC_{50} *Aliivibrio fischeri* 30min % (IC 95%)**	**LC_{50} *Aliivibrio fischeri* 30min µg/mL (IC 95%)**	**Toxicity effect**
1	Terpineol 125 + Gentamycin 3.9	38.740 (31.845-47.492)	48.425 (39.806-59.365) + 1.511 (1.242-1.852)	20.555 (12.805-28.445)	25.694 (16.006-35.556) + 0.802 (0.499 + 1.109)	Addition	38.778 (36.787-34.003)	48.472 (45.984-42.504) + 1.512 (1.435-1.326)	------
2	Terpineol 62.5 + Gentamycin 3.9	94.951 (78.227-117.472)	59.344 (48.892-73.420) + 3.703 (3.051-4.581)	50.589 (42.340-60.242)	31.618 (26.462-37.651) + 1.973 (1.651- 2.349)	Antagonism	67.120 (61.410-72.854)	41.950 (38.381-45.534) + 2.618 (2.395-2.841)	------
3	Terpineol 125 + Chloramphenicol 15.6	29.888 (24.079-37.002)	37.360 (30.099-46.252) + 4.663 (3.756-5.772)	6.272 (2.002-11.440)	7.84 (2.502-14.3) + 0.978 (0.312+1.785)	Synergism	10.202 (8.771-11.775)	12.752 (10.964-14.719) + 1.592 (1.368-1.837)	Synergism
4	Terpineol 125 + Tetracycline 15.6	46.517 (37.729-58.821)	58.146 (47.161-73.526) + 7.257 (5.886-9.176)	20.861 (16.180-25.885)	26.077 (20.225-32.356) + 3.254 (2.524-4.038)	Addition	-[b]	-[b]	-[b]
5	Terpineol 62.5 + Florfenicol 7.8	82.047 (67.614-100.475)	51.279 (43.259-62.797) + 6.399 (5.2724+7.837)	51.959 (43.048-62.472)	32.474 (26.905-39.045) + 4.053 (3.358-4.873)	Antagonism	59.900 (54.119-65.717)	37.437 (33.824-41.073) + 4.672 (4.221-5.126)	------

[a] *SACTA: Synergistic Antimicrobial Combinations of Terpineol and Antibiotics*

[b] Data no obtained for incompatibility with method used.

LC_{50} Daphnia magna

[1] LC_{50} (24h)= 875.5 µg/mL (Lomba et al.,2020)

[3] LC_{50} (24h)= 500 µg/mL (Czech et al.,2014)

[4] LC_{50} (48h)= 372.4 µg/mL (Choi et al.,2009)
[4] LC_{50} (48h)= 500 µg/mL (Czech et al.,2014)
[4] LC_{50} (48h)= 1086 µg/mL (Calleja et al.,1994)
[4] LC_{50} (48h)= 227-600 µg/mL (Muller et al.,1982)

[6] LC_{50} (48h)= >340 µg/mL (Wollenberger et al.,2000)
[6] LC_{50} (48h)= 90 µg/mL (Choi et al.,2009)
[6] LC_{50} (48h)= >100 µg/mL (Zulal et al.,2020)
[6] LC_{50} (48h)= 816 µg/mL (Havelkova et al.,2016)
[7] LC_{50} (48h)= >100 µg/mL (Carraschi et al.,2015)

LC_{50} Aliivibrio fischeri

[2] LC_{50} (30min)= >10000 µg/mL (Lomba et al.,2020)

[5] LC_{50} (15min)= 537.5 µg/mL (Choi et al.,2009)

[8] LC_{50} (30min)= 29.6 µg/mL (Kołodziejskal et al.,2013)

Anexo 5.2

Propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua empleadas

Tipo de ecosistema	Parámetro analizado	Resultado
Acuático	Temperatura del agua (ºC)	17
	pH	7.5
	Conductividad eléctrica (mS)	2.8

Anexo I:

Resto de méritos derivados del trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral

a) Publicaciones en las que he participado como coautor, pero que no forman parte de la presente tesis doctoral:

Gan, C.; Langa, E.; Valenzuela, A.; Ballestero, D.; Pino-Otín, M.R. Synergistic Activity of Thymol with Commercial Antibiotics against Critical and High WHO Priority Pathogenic Bacteria. Plants 2023, 12, 1868.

b) Pósteres presentados en congresos científicos:

SETAC Europe 34th Annual Meeting, Sevilla, España, 5–9 de mayo de 2024: *Assessing the Ecotoxicity of Thymol and Carvacrol Isomers on Aquatic and Terrestrial Organisms*.

SETAC Europe 34th Annual Meeting, Sevilla, España, 5–9 de mayo de 2024. *Exploring the Potential of a Byproduct from Essential Oil Distillation: Ecotoxicity of Lavandin Hydrolates.*

ESCMID Global 2024 (34th Congress of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), Barcelona (España), 27–30 de abril de 2024. *Optimising Biofilm Management: Thymol's Synergistic Partnership with Antibiotics.*

ESCMID Global 2024 (34th Congress of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), Barcelona (España, 27–30 de abril de 2024. *Carvacrol: A Natural Defense against Staphylococcus aureus and its Aminoglycoside Resistance.*

SETAC Europe 33rd Annual Meeting, Dublín, Irlanda, 30 de abril – 4 de mayo de 2023. *Ecotoxicological Impact of Gentamicin, Streptomycin and Ampicillin on Soil and Water Bioindicators.*

SETAC Europe 33rd Annual Meeting, Dublín, Irlanda, 30 de abril – 4 de mayo de 2023. *Effects of the Antimicrobial Agent Thymol on the Physiological Profile of River Microbiota.*

SETAC Europe 33rd Annual Meeting, Dublín, Irlanda, 30 de abril – 4 de mayo de 2023. *Impact of the Monoterpene Eugenol on the Physiological Profile of River Microbiota.*

SETAC Europe 33rd Annual Meeting, Dublín, Irlanda, 30 de abril – 4 de mayo de 2023. *Ecotoxicity of Hydroquinone on Non-target Soil and Water Organisms.* (primer autor)

SETAC Europe 32nd Annual Meeting, Copenhague, Dinamarca, 15–19 de mayo de 2022.*Ecotoxicity of Three Widely Used Antibiotics on Non-target Soil and Water Organisms.*

SETAC Europe 32nd Annual Meeting, Copenhague, Dinamarca, 15–19 de mayo de 2022. *Comparative Study of the Ecotoxicity in Water and Soils of 4 Hydrolates and 2 Natural Products of Plant Origin.*

SETAC Europe 32nd Annual Meeting, Copenhague, Dinamarca, 15–19 de mayo de 2022. *Effects of Tannic Acid on the Physiological Profile of River Microbiota.*

SETAC Europe 32nd Annual Meeting, Copenhague, Dinamarca, 15–19 de mayo de 2022. *Comparison of the Effects of Citronellol and Tannic Acid on the Physiological Profile of Soil Microbiota.*

c) Estancias realizadas:

Grupo de Investigación AMIB. Programa de Doctorado en Medio Ambiente. Aprendizaje de técnicas de evaluación del crecimiento microbiano en biofilm para el desarrollo de la tesis doctoral, en colaboración con el grupo de investigación AMIB, con el que colabora el grupo ECO2CHEM.
Fecha de inicio: diciembre de 2022
Fecha de fin: marzo de 2023

d) Becas concedidas

FPI DGA – Antonio Valenzuela
Fecha de inicio: 1 de enero de 2022
Fecha de fin: 31 de diciembre de 2025

Ayudas para la formación de investigadores Fundación Banco Sabadell
Fecha de inicio: 15 de septiembre de 2021
Fecha de fin: 31 de diciembre de 2021