

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA EN AGROECOSISTEMAS ARROCEROS EN EL CENTRO DE PORTUGAL

Isabel Maria Duarte ^{1 2}, Paula Amador ¹, Helena Marques ¹, Teresa Vasconcelos ¹, José Manuel Gonçalves¹

RESUMEN: La exigencia de la sociedad para la preservación de los recursos hídricos ha llevado a grandes avances en la tecnología y en la gestión agrícola para limitar sus impactos negativos, favorecer el desarrollo socioeconómico y promover la conservación de los recursos naturales. Esta comunicación se refiere a un estudio de monitoreo de la calidad microbiológica del agua en el agroecosistema arrocero del Baixo Mondego, Centro de Portugal, en el marco del proyecto PROMEDRICE (www.promedrice.org). Los indicadores de calidad microbiana fueron los recuentos de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), enterococos fecales (EF) y *Enterobacteriaceae* resistentes a la ampicilina (E-Ampr) realizados según métodos analíticos de referencia. Los resultados muestran que el agua de riego de las diversas parcelas contenía una elevada carga microbiológica. El agroecosistema del arroz tuvo un impacto beneficioso en la carga de CT, CF y EF del agua de drenaje, con una disminución de dos órdenes de magnitud entre los valores de estos recuentos en las entradas y en las salidas de los arrozales. Sin embargo, los recuentos de E-Ampr aumentaron en el suelo del arrozal debido a la especificidad de este ecosistema de zonas húmedas y a la actividad de la vida silvestre. Este estudio evaluó los riesgos de contaminación microbiológica del agua de riego y el efecto beneficioso del agroecosistema del arroz en su control, particularmente la contaminación microbiológica de los agricultores o de los problemas ambientales, proporcionando información para apoyar la gestión del agua y mitigar estos problemas.

PALABRAS-CLAVE: coliformes, *Enterobacteriaceae*, resistencia a antibióticos, agroecosistema basado en el arroz, indicadores microbiológicos.

¹¹ Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária, Bencanta, 3045-601 Coimbra, Portugal; IIA, Instituto de Investigação Aplicada, CERNAS, Centro de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade. iduarte@esac.pt, hmarques@esac.pt, paula_amador@esac.pt, tvasconcelos@esac.pt, jmmg@esac.pt

² Autor para correspondência: iduarte@esac.pt; Tel.: +351239802974

INTRODUCCIÓN

El desarrollo, la sostenibilidad y la competitividad empresarial de la agricultura portuguesa dependen fuertemente del riego (SILVA, 2018). A su vez, los cambios globales llevan a una disminución de los recursos hídricos disponibles (SORDO-WARD *et al.*, 2019), lo que implica que el ahorro de agua es estratégico para el desarrollo de la agricultura. La gestión de los perímetros hidroagrícolas con origen superficial tiene características específicas, especialmente si hay reutilización de agua de drenaje, como ocurre en el Aprovechamiento Hidroagrícola del Baixo Mondego (AHBM), generando preocupaciones de seguridad (DATTA *et al.*, 2017). Por ello, es importante monitorear la calidad microbiológica del agua para obtener información para su gestión racional, reducir los riesgos ambientales y de salud pública (LENTON *et al.*, 2014).

Los coliformes fecales, como la *Escherichia coli*, encontrada principalmente en el intestino de humanos y animales de sangre caliente, se utiliza como indicador de la calidad microbiológica del agua. Estas bacterias, indicadoras de contaminación fecal y, por lo tanto, de la supuesta presencia de microorganismos patógenos, son relevantes debido a las enfermedades de transmisión hídrica (condiciones de saneamiento y calidad del agua potable), así como en la evaluación de los impactos ambientales causados por la acción antropológica. Dado que los recursos hídricos pueden verse afectados por diversas actividades desarrolladas en las cuencas hidrográficas, es importante estudiar la calidad del agua que entra en un sistema y es devuelta al medio hídrico después de su uso. Además, existe una preocupación global emergente relacionada con la salud y la resistencia a los antibióticos (AB), involucrando la transferencia de genes y bacterias entre humanos, animales y medio ambiente. Los eventos de transmisión de cepas resistentes a los AB son comunes; por lo tanto, es crucial cuantificar las vías e identificar los sumideros y los cuellos de botella para la transmisión ambiental, para gestionar este problema (LARSSON *et al.*, 2022). Este estudio de caso en agroecosistemas en el Centro de Portugal tiene como objetivo evaluar el impacto de la actividad arrocerá en la calidad microbiológica del agua.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el AHBM, ubicado en la parte baja de la cuenca hidrográfica del Río Mondego, en el Centro de Portugal, aguas abajo del Azud de Coimbra. Este valle recibe agua superficial del Río Mondego y contribuciones de varios cursos de agua afluentes en

ambas márgenes, zonas donde se cultiva arroz, correspondiendo a alrededor del 45% del área Riegoda del AHBM (GONÇALVES *et al.*, 2022).

El estudio se realizó durante las campañas agrícolas de 2023 y 2024 en cuatro explotaciones arroceras de productores locales (AM, QF, QC, QA) ubicadas en el Baixo Mondego (BM), en la parte baja del AHBM (Figura 1). Los criterios de selección de estos arrozales atendieron a la mejor representatividad de las características del suelo, del riego y de las prácticas culturales adoptadas en la producción de arroz, para considerar la variabilidad espacial existente en el valle.

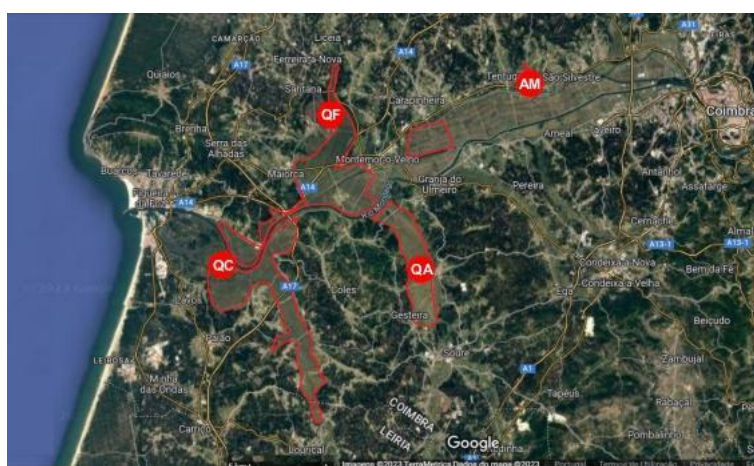


Figura 1. Áreas de arroz del Baixo Mondego, señaladas con una línea roja (fuente: Google maps, 2024) y ubicación de los campos experimentales (rojo): AM, QF, QC, QA.

Los sitios de muestreo se concentraron en las entradas y salidas de cuatro fincas y sus respectivos arrozales, para evaluar el impacto de la actividad arroceras en la calidad del agua drenada. La metodología de monitoreo de la calidad del agua de las redes de riego y drenaje siguió las directrices publicadas (LOTHROP *et al.*, 2018). El muestreo se realizó en los meses de julio y agosto, período de sequía, cuando ocurren los caudales más bajos en las líneas de agua. Las muestras de agua se recolectaron en botellas de plástico estériles y se mantuvieron a 4°C hasta el procesamiento microbiológico, realizado hasta cuatro horas después de la recolección. El análisis microbiológico incluyó la enumeración de Coliformes Totales (CT), Coliformes Fecales (CF) y Enterococos Fecales (EF) mediante el método de dilución con la técnica de fermentación en tubos múltiples, según los métodos analíticos de referencia (DL 236, 1998); (DL 306, 2007).

El recuento de *Enterobacteriaceae* resistentes a la ampicilina (E-Ampr) en las muestras de agua se realizó mediante la técnica de filtración por membrana (AMADOR *et al.*, 2015).

Los antibiogramas se realizaron directamente al cultivo mixto de los aislados, utilizando pruebas directas de susceptibilidad antimicrobiana (ZEBOUH *et al.*, 2008). La caracterización fenotípica se realizó para trece AB, representativos de las clases más utilizadas en la medicina humana y en la ganadería en Portugal (AMADOR *et al.*, 2015). El método de difusión en disco de Kirby-Bauer se realizó de acuerdo con las directrices para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana definidas por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). La resistencia se registró como cualquier crecimiento hasta el borde del disco de AB, mientras que la sensibilidad se definió como una zona de inhibición completa para todos los taxones bacterianos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Indicadores microbiológicos de la calidad del agua

El análisis de la calidad microbiológica del agua, evaluada mediante la enumeración de grupos de indicadores en las principales entradas y salidas de cada campo de ensayo (Figura 2), muestra el efecto de la arrocería en la calidad del agua a su salida.

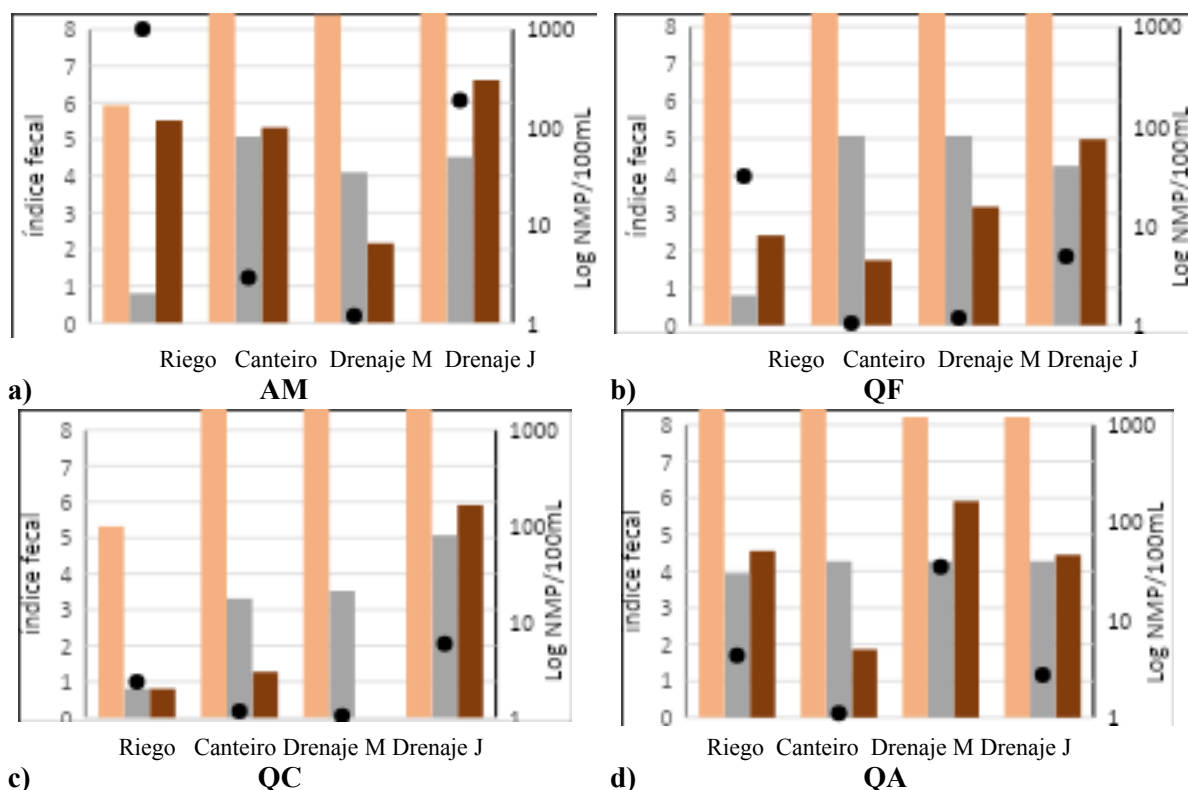


Figura 2. Valores medios de los recuentos (y desviación estándar) de Coliformes Totales (■), Coliformes Fecales (■), Enterococos Fecales (■), expresados en NMP/100mL, e Índice Fecal (●) en el agua de riego, del canteiro y de la drenaje, aguas arriba (M) y aguas abajo (J) en: (a) AM, (b) QF, (c) QC, (d) QA.

Los CT están muy difundidos, alcanzando medias por encima de los 1900 NMP/100 mL en todos los sitios muestreados, sin diferencias significativas entre los recuentos de agua de riego y de drenaje. Estos valores se sitúan entre el máximo recomendado en la legislación (500 NMP/100mL) y el máximo admisible (10.000 NMP/100mL) para fines balnearios (DL 236, 1998). No existe regulación específica para las aguas de drenaje agrícola respecto a este parámetro, pero la proximidad de la Playa de Figueira da Foz justifica esta preocupación.

Los recuentos de CF (Figura 2) en las muestras de agua de riego de los arrozales de AM están por encima de los 100 NMP/100 mL, incumpliendo los objetivos ambientales de calidad establecidos (DL 236, 1998). Esta elevada concentración de CF en el agua disponible para el riego del arroz se explica por la contaminación aguas arriba del área del arrozal, de fuente no identificada. Valores medios de CF elevados también se registraron en las muestras de drenaje (300 NMP/100 mL). Los recuentos de CF en el riego son significativamente más elevados que en las muestras de agua del canteiro en QA (90%). Este hecho puede explicarse por el efecto del suelo en la reducción del número de este grupo (TAPIAS *et al.*, 1997). Estos resultados están de acuerdo con los de FRIZZO *et al.* (2012), que demuestran el potencial de los agroecosistemas arroceros de Brasil para circular los nutrientes, resultando así en una menor concentración de estos agentes microbianos en el agua de drenaje que en la de riego.

El estándar de calidad establecido para el agua de riego se refiere a los requisitos de calidad para la reutilización de aguas residuales urbanas tratadas en el riego de áreas agrícolas, forestales, ornamentales, viveros, céspedes y otros espacios verdes (IPQ, 2006). En cuanto a los requisitos de calidad microbiológica, esta norma (RICART *et al.*, 2019) tuvo en cuenta la utilización de cultivos de Riegodío (por ejemplo, para consumo humano o animal, o cultivos industriales) y el respectivo método de riego aplicado, que es menos restrictivo y más flexible que el establecido en la legislación portuguesa (DL 236, 1998). Según (MONTE y ALBUQUERQUE (2010)], esta legislación portuguesa es muy exigente ya que el agua de la mayoría de los ríos no presenta CF por debajo de los 100 NMP/100 mL.

El análisis del Índice Fecal (GERBA *et al.*, 2013) revela que en las muestras del agua de drenaje de AM, y de riego de QF existen indicios de contaminación fecal de origen humano, mientras que la de los canteiros evidencia la influencia del efecto de la vida silvestre.

***Enterobacteriaceae* resistentes a la ampicilina**

Las medias de los recuentos de E-Ampr revelaron una elevada variabilidad entre los sitios de muestreo y el tipo de muestra (Figura 3). Los recuentos medios más elevados se encontraron en muestras recolectadas en AM y QA. Se verificó un aumento de un orden de magnitud entre los recuentos en el agua de riego y en la de los canteiros, lo que puede explicarse por el efecto de las descargas de aguas de drenaje de otras fuentes, aguas abajo de los arrozales, con elevadas concentraciones de E-Ampr. A pesar de esta elevada variabilidad dentro de cada sitio, no se verificó un aumento, y con excepción de QC, incluso ocurrió una reducción media entre los recuentos de Ampr en el agua de riego y en la respectiva drenaje en AM.

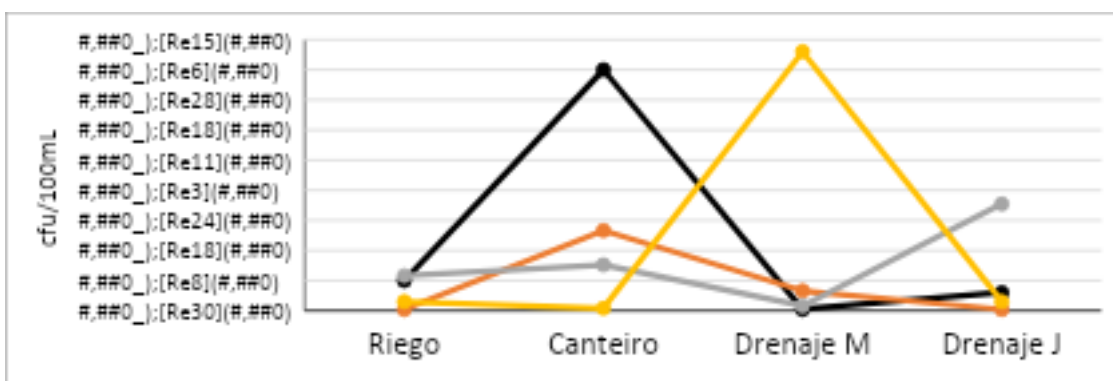


Figura 3. Valores medios de los recuentos de Ampr de *Enterobacteriaceae*, expresados en cfu/mL (y desviación estándar) en las muestras del agua de riego, canteiro de la drenaje, aguas arriba (M) y aguas abajo (J) de: AM (●), QF (➔), QC (●), QA (●).

La carga microbiológica proveniente de estiércol introducido directamente en el suelo en determinadas áreas del BM, utilizado en otras culturas, convierte el riesgo microbiológico emergente, posiblemente debido a la presencia de genes de resistencia AB (AMADOR *et al.*, 2019). Estos resultados demuestran que las Buenas Prácticas Agrícolas deben ser observadas en términos de manejo del estiércol y del purín (RICART *et al.*, 2019). La actividad pecuaria intensiva debe compostar totalmente estos residuos antes de ser incorporados en el suelo, principalmente para la producción de maíz y pastos.

En los sitios AM, QF y QC se registraron valores significativamente más elevados de recuentos de E-Ampr en el agua de los canteiros que en la de riego, pero en la de drenaje los recuentos disminuyen significativamente, lo que puede explicarse por el efecto del suelo en la reducción del número de *Enterobacteriaceae* (TAPIAS, 1997).

Un aspecto crítico adicional asociado a los contaminantes fecales es la resistencia frecuente a los AB encontrados en los sistemas acuáticos, particularmente a los β -lactámicos (ej. ampicilina), colocando la calidad del agua y la salud pública en una situación crítica. La identificación de situaciones de riesgo de contaminación microbiológica en las aguas de riego del BM, cuya principal responsabilidad es externa, exige medidas de precaución especiales, particularmente en lo que respecta a la seguridad de los agricultores y de los consumidores.

Caracterización fenotípica de la resistencia a los antibióticos

Los aislados de *Enterobacteriaceae* presentaron una elevada resistencia a la mayoría de los AB testados (Figura 4). Entre los β -lactámicos, las penicilinas (amoxicilina/ácido clavulánico), las cefalosporinas de 3^a generación (CAZ y CTX), el monobactámico aztreonam (ATM), el carbapenemo (MEM) seguidos de la cefalosporina de segunda generación (FOX) fueron los AB para los cuales se encontraron más resistencias. En relación a las clases de AB no- β -lactámicos, se observó un mayor porcentaje de aislados resistentes al cloranfenicol (CHL) y a las sulfonamidas (SXT) seguido de la tetraciclina (TET). Este resultado puede explicarse por el uso intensivo de esta clase de AB durante muchos años en la medicina veterinaria y en la producción animal intensiva en la Región (AMADOR *et al.*, 2017)

Los patrones de resistencia a AB de la globalidad de las muestras no revelaron diferencias significativas entre la prevalencia en el agua a la entrada y a la salida de los arrozales. Las muestras de agua de drenaje de los canteiros presentaron un 100% de resistencia a AMC, CAZ, ATM, CHL y SXT, con igual porcentaje que la respectiva agua de riego. Las mayores reducciones en los porcentajes de resistencias a los AB entre las muestras del agua de riego y de drenaje se detectaron para los siguientes AB FOX, CTX, CPO y CIP. En cambio, los mayores aumentos de estos valores se registraron para IPM, GEN y TET.

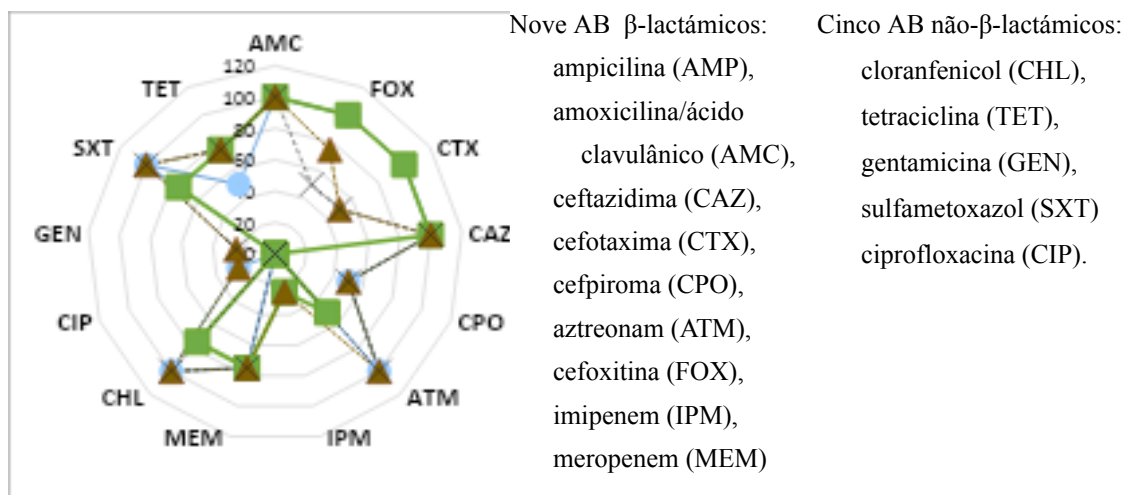


Figura 4. Frecuencia relativa de los patrones de resistencia a antibióticos de los aislados de *Enterobacteriaceae* obtenidos a partir de todas las muestras recolectadas en 2024 de agua de riego (♦), de canteiro (■) y drenaje aguas arriba (▲) y aguas abajo (✕).

Los aislados de los arrozales presentaron porcentajes de resistencia relativa, tanto para los β -lactámicos como para los no- β -lactámicos, idénticos o superiores en el agua de riego en relación a la de los canteiros. Sin embargo, en la drenaje estos valores son aún más elevados, con excepción del CTX. Una hipótesis explicativa de estos resultados reside en el hecho de que, al ser reutilizada para riego, el agua de drenaje entra en un ciclo que permite la acumulación de microorganismos resistentes, favoreciendo la transferencia de genes de resistencia a AB por recombinación bacteriana. El aumento de las frecuencias de variación relativa de las resistencias a AB en el agua del suelo de los arrozales (Tabla 2), se debe también posiblemente a las condiciones del ecosistema de producción de arroz que facilitan la transferencia del gen de resistencia a AB.

La elevada prevalencia de aislados resistentes a los β -lactámicos, especialmente a las penicilinas y a las cefalosporinas de 2^a, 3^a y 4^a generación, se debe probablemente al uso y abuso de esta clase de AB durante muchos años en la ganadería para el tratamiento de infecciones y como promotor de crecimiento. La producción pecuaria en el área alrededor del AHBM explica posiblemente estas elevadas frecuencias de resistencia AB. Por un lado, los animales de producción son frecuentemente una importante fuente de microorganismos patógenos en el suelo y en las cuencas hidrográficas de los sistemas acuáticos (JAMIESON *et al.*, 2003) y, por otro, la actividad de ganadería en la Región recurre a la administración de AB para fines veterinarios (BÖGER *et al.*, 2021).

Tabela 2. Prevalencia de fenotipos de resistencia a las principales clases de antimicrobianos de las muestras.

Local	Tipo de muestra	Fenotipo de Resistencia
AM	Riego	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, IPM, MEM, CHL, CIP, SXT, TET
	Canteiro	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, SXT, TET
	Drenaje montante	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, GEN, SXT, TET
	Drenaje jusante	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, SXT, TET
QF	Riego	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, CHL, SXT
	Canteiro	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, IPM, MEM, CHL, SXT, TET
	Drenaje montante	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, IPM, MEM, CHL, SXT, TET
	Drenaje jusante	PEN, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, SXT
QC	Riego	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, SXT, TET
	Canteiro	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, IPM, MEM, CHL, SXT, TET
	Drenaje montante	PEN, AMC, CTX, CAZ, CPO, ATM, IPM, MEM, CHL, SXT, TET
	Drenaje jusante	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, GEN, SXT, TET
QA	Riego	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, SXT, TET
	Canteiro	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, MEM, CHL
	Drenaje montante	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, CIP, SXT, TET
	Drenaje jusante	PEN, AMC, FOX, CTX, CAZ, CPO, ATM, MEM, CHL, SXT, TET

AB: Diez β -lactámicos: penicilina (PEN), ampicilina (AMP), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefpiroma (CPO), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), meropenem (MEM) y cinco no β -lactámicos: cloranfenicol (CHL), tetraciclina (TET), gentamicina (GEN), sulfametoxazol (SXT) y ciprofloxacina (CIP).

Frente a los resultados obtenidos en este estudio, corresponde a la Asociación de Riegantes y a los agricultores adaptar el modo de funcionamiento y las tecnologías para minimizar los impactos negativos del uso del agua en la conservación de la calidad de los recursos hídricos. El monitoreo de la calidad del agua en el perímetro de riego es fundamental para conocer la realidad local a lo largo del tiempo y permitir que los ajustes sean lo más eficaces posible (LOTHROP *et al.*, 2018; BÖGER *et al.*, 2021; STINE *et al.*, 2005; Winfield *et al.*, 2003) así como informar a los agricultores sobre precauciones especiales y áreas de seguridad donde la contaminación microbiológica presenta mayor riesgo (CAMEIRA *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

En relación a los indicadores de la legislación sobre el agua de riego, en este caso utilizada en sistema de canteiro en cuencas de nivel, se concluyó que las enumeraciones de coliformes totales en el agua de drenaje superficial son superiores a las del agua de riego de los canales de distribución. A su vez, el agua superficial del canteiro tiene un recuento de coliformes fecales menor que el agua de riego y de drenaje aguas abajo. Esta presenta valores más elevados que en la drenaje aguas arriba, en tres de los cuatro casos de estudio, situación

que requiere continuidad de monitoreo para la comprensión del fenómeno. Por el contrario, los recuentos de enterococos fecales aumentaron dentro del canteiro en relación al agua de riego. Este análisis de la calidad microbiológica de las muestras de agua de riego y de drenaje aguas arriba revela fuentes de contaminación externa a los campos de arroz.

En relación al análisis de resistencia AB, se reveló la situación opuesta en relación al análisis microbiológico de los parámetros legislados. La enumeración de *Enterobacteriaceae* resistentes a la ampicilina permanece idéntica o aumenta en las salidas en comparación con las entradas. Los fenotipos de resistencia AB a todos los 13 AB analizados están ampliamente diseminados en estos agroecosistemas y también son altamente prevalentes en muestras recolectadas de entradas y salidas. La frecuente resistencia a los AB encontrada en estos sistemas acuáticos, particularmente a los de la clase de los β -lactámicos, es un punto crítico, que puede poner en riesgo la calidad del agua y la salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADOR, P., DUARTE, I.M. ROBERTO DA COSTA, R.P., FERNANDES, R., PRUDÊNCIO, C.. Characterization of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* from agricultural manure and soil in Portugal. *Soil Science* **2017**, 182(8), 292-301, doi: 10.1097/SS.0000000000000222.

AMADOR, P., FERNANDES, R., PRUDÊNCIO, C., DUARTE, IM..: Prevalence of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* on Portuguese livestock manure. *Antibiotics* **2019**, 8(1), 23, doi:10.3390/antibiotics8010023.

AMADOR, P., RUBEN M.F., PRUDÊNCIO, M.C., BARRETO, M.P., DUARTE, I.M Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of Class A and Class C β -lactamases. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **2015**, 50(1), 26-39, doi:10.1080/10934529.2015.964602.

BÖGER, B., SUREK, M., VILHENA, R.O., FACHI, M.M., JUNKERT, A.M., SANTOS, J.M.M.F., DOMINGOS, E.L., COBRE, A.F., MOMADE, D.R., PONTAROLO, R. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. *Journal of Hazardous Materials* **2021**, 402, 123448, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123448.

CAMEIRA, M.R.; LI, R.; FANGUEIRO, D. Integrated modelling to assess N pollution swapping in slurry amended soils. *Science of The Total Environment* **2020**, 713, 136596, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136596.

CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 30th ed., Vols. 40, 1). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020. <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>

DATTA, A.; ULLAH, H.; FERDOUS, Z. Water management in rice. In *Rice Production Worldwide*, Chauhan, B.S., Ed.; Springer Int. Pub. AG, **2017**, pp. 255-277.

DECRETO-LEI 236/98, de 08-01-1998. Estabelece padrões de qualidade da água. Diário da República, 76/1998, Série I-A, 3676–3716, Ministério do Ambiente, Presidência Portuguesa do Conselho de Ministros, Lisboa, Portugal (1998), <https://dre.pt/pesquisa/search/430457/details/maximized>.

DECRETO-LEI 306/2007, de 27-08-2007. Estabelece Padrões de Qualidade da Água para consumo humano. Diário da República, 164/2007, Série I, 5747-5765, Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Desenvolvimento Regional, Presidência Portuguesa do Conselho de Ministros, Lisboa, Portugal (2007), <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/306/2007/08/27/p/dre/pt/html>. (Português)

FRIZZO, C., MACHADO, V., DE OLIVEIRA, J.V., FIUZA, L.M.. Microbiological quality of the rice-field water in the South Brazil. *Neotropical Biology and Conservation* **2012**, 7(1), 16-20, doi:10.4013/nbc.2012.71.03.

GERBA, C.P. Indicator Microorganisms. In *Environmental Microbiology*, 3rd ed.; Pepper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T.J., 18. Eds.; Academic Press, 2015; pp. 551-564, doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00023-5

GONÇALVES, J.M.; NUNES, M.; FERREIRA, S.; JORDÃO, A.; PAIXÃO, J.; EUGÉNIO, R.; RUSSO, A.; DAMÁSIO, H.; DUARTE, I.M.; BAHCEVANDZIEV, K. Alternate Wetting and Drying in the Center of Portugal: Effects on Water and Rice Productivity and Contribution to Development. *Sensors* **2022**, 22, 3632. doi.org/10.3390/s22103632

IPQ (Instituto Português da Qualidade). Portuguese Standard on Urban Wastewater Reuse Treated in Irrigation; NP 4434; IPQ, Lisbon, Portugal, **2006**. (Português)

JAMIESON, R.C., GORDON, R.J., TATTRIE, S.C., STRATTON, G.W. Sources and persistence of fecal coliform bacteria in a rural watershed. *Water Quality Research Journal* **2003**, 38(1), 33-47, doi: 10.2166/wqrj.2003.004.

LARSSON, D.G., FLACH, C.F. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology* **2022**, 20(5), 257-269, doi:10.1038/s41579-021-00649-x.

LENTON, R. Irrigation in the twenty-first century: Reflections on science, policy and society. *Irrigation and Drainage* **2014**, 63(2), 154-157, doi:10.1002/ird.1844.

LOTHROP, N., BRIGHT, K.R., SEXTON, J., PEARCE-WALKER, J., REYNOLDS, K.A., VERHOUGSTRAETE, M.P. Optimal strategies for monitoring irrigation water quality. *Agricultural Water Management* **2018**, 199, 86-92, doi:10.1016/j.agwat.2017.12.018.

MEDWATERICE: Towards a sustainable water use in Mediterranean rice-based agro-ecosystems. Available online: <https://www.medwaterice.org/>, accessed on 01/11/2021.

MONTE, H., ALBUQUERQUE, A. *Wastewater Reuse*; Guias Técnicos Series; ISEL-ERSAR: Lisbon, Portugal, **2010**. (Português) <http://hdl.handle.net/10400.6/1144>.

RICART, S., RICO, A.M.; RIBAS, A. Risk-yuck factor nexus in reclaimed wastewater for irrigation: Comparing farmers' attitudes and public perception. *Water* **2019**, 11(2), 187, doi:10.3390/w11020187.

SILVA, F.G. The future of irrigation in an integrated logic of water resources management. *Agrotec* **2018**, 27, 46–49. (Português)

SORDO-WARD, A., GRANADOS, A., IGLESIAS, A., GARROTE, L., BEJARANO, M.D. Adaptation effort and performance of water management strategies to face climate change. Impacts in six representative basins of Southern Europe. *Water* **2019**, 11(5), 1078, doi:10.3390/w11051078.

STINE, S.W., SONG, I., CHOI, C.Y., GERBA, C.P. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *Journal of Food Protection* **2005**, 68(5), 913-918, doi:10.4315/0362-028X-68.5.913.

TAPIAS, J.C. Estrategia de gestion de los recursos hídricos en los campos de golf. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Spain, 432 p. (1997), <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=238410>.

WINFIELD, M.D., GROISMAN, E.A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, 69(7), 3687-3694, doi:10.1128/AEM.69.7.3687.

ZEBOUH, M., THOMAS, C., HONDERLICK, P., LEMEE, L., SEGONDS, C., WALLET, F., HUSSON, M.O. Direct antimicrobial susceptibility testing method for analysis of sputum collected from patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **2008**, 7(3), 238-243, doi:10.1016/j.jcf.2007.10.002.