

ISBN: 978-84-938046-4-0

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS AISLADAS DE MUESTRAS DE AGUA EN GRAN CANARIA Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES EMERGENTES

María Teresa TEJEDOR-JUNCO¹, Margarita GONZÁLEZ MARTÍN¹, Pablo LUPIOLA GÓMEZ¹, Esmeralda ESTÉVEZ², María del Carmen CABRERA² y Sarah MONTESEDOCA ESPONDA³

¹Departamento de Ciencias Clínicas (Microbiología). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado de Correos 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria, España.

mariateresa.tejedor@ulpgc.es ; margaritarosa.gonzalez@ulpgc.es ; plupiola@dcc.ulpgc.es

² Departamento de Física. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España, mcarmen.cabrera@ulpgc.es; eestevez@proyinves.ulpgc.es

³Departamento de Química. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España. smontesdeoca@becarios.ulpgc.es

RESUMEN

Hemos analizado la posible relación entre la presencia de contaminantes emergentes en agua regenerada para riego, agua del lixiviado del suelo y agua subterránea y la resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas. Se tomaron muestras de agua (galería, solución de suelo, pozo y riego). Cada muestra se dividió en dos partes. Una se centrifugó y se sembró en diferentes medios. Cincuenta mililitros de la segunda parte se añadieron a Caldo Brain Heart. En la siembra directa de agua de riego y solución del suelo se detectaron numerosas colonias. El crecimiento en la siembra directa de agua de galería fue escaso, y no hubo crecimiento cuando se sembró agua de pozo. Mediante enriquecimiento en Caldo BHI y resiembra posterior, se obtuvieron numerosas colonias en todos los medios y muestras. Encontramos dos géneros de Gram positivos (*Enterococcus* y *Staphylococcus*). La mayoría de las cepas presentaba una sensibilidad alta a antibióticos. En agua de riego se aisló una cepa de *Enterococcus* resistente a todas las quinolonas ensayadas. Entre los bacilos Gram negativos, encontramos diversos géneros de Enterobacterias y otros géneros (*Vibrio* y *Pseudomonas*). Aparece un elevado porcentaje de cepas resistentes a la combinación Amoxicilina + Ácido Clavulánico. No parece haber correlación con la presencia de otros contaminantes emergentes, aunque sería necesario analizar un mayor número de muestras.

Palabras clave: *Antibióticos, Resistencia, Contaminantes emergentes.*

ABSTRACT

We have analyzed the possible relationship between the presence of emerging contaminants in reclaimed irrigation water, soil water and groundwater and antibiotic resistance of the isolated bacteria. Water samples were taken. Each sample was divided

into two parts. One was centrifuged and cultured in different media. Fifty milliliters of the second part was added to Brain Heart Broth. In direct culture of irrigation water and soil solution, numerous colonies were detected. When gallery water was directly cultured, growth was scarce, and no growth was observed when well water was directly cultured. By BHI broth enrichment and subsequent plating, numerous colonies were obtained in all media and samples. We found two kinds of Gram positive (*Staphylococcus* and *Enterococcus*). Most of the strains have a high sensitivity to antibiotics. In irrigation water, an *Enterococcus* strain resistant to all quinolones tested was isolated. Among the Gram negative bacilli, we found different genera belonging to *Enterobacteriaceae* and other genera (*Vibrio* and *Pseudomonas*). A high percentage of strains were resistant to Amoxicillin + Clavulanic acid combination. It seems that there is no correlation among resistance and the presence of emerging contaminants, although it would be necessary to analyze a larger number of samples.

Key words: *Antibiotics, Resistance, Emerging contaminants.*

INTRODUCCIÓN

Los compuestos emergentes son contaminantes que aún no están contemplados por la legislación y cuyos efectos adversos no se conocen con exactitud (Petrovic et al., 2004). El consumo de distintos compuestos considerados emergentes, como por ejemplo fármacos y productos de cuidado personal, se sitúa en miles de toneladas cada año, incorporándose a las aguas medioambientales por diversas vías, entre las que destacan las aguas residuales que no son adecuadamente tratadas en las estaciones depuradoras (Montesdeoca-Esponda et al., 2014a).

En Gran Canaria, la reutilización de aguas depuradas para riego es una práctica habitual desde hace más de treinta años, dada la escasez de recursos hídricos que existe en la isla (Marrero y Palacios, 1996). El programa CONSOLIDER-TRAGUA, desarrollado entre 2009 y 2013, ha tenido como objetivo en Gran Canaria la evaluación de la afección al acuífero de la reutilización de aguas regeneradas. Los trabajos del programa incluyeron la determinación de contaminantes emergentes en muestras ambientales de agua de diversos orígenes, cuyos resultados son objeto de otra comunicación en este mismo Workshop (Montesdeoca-Esponda et al, 2014b).

La relación entre diversos contaminantes emergentes y la resistencia bacteriana a antibióticos ha sido descrita por diversos autores. Pumbwe et al. (2007) demostraron la relación entre la presencia de compuestos con anillo benceno (como el ibuprofeno) y la aparición de cepas de *Bacteroides* multirresistentes. Por ello, a partir de los resultados de emergentes obtenidos en la zona de estudio, se planteó la necesidad de contrastar sus niveles con la existencia de bacterias resistentes a diversos antimicrobianos. Las determinaciones realizadas en este sentido son objeto de la presente comunicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la zona de muestreo

Como zona de muestreo se seleccionó el acuífero subyacente al Campo de Golf de Bandama, situado en la Cuenca de Las Goteras, entre los 400 y los 500 m de altura al NE de Gran Canaria. El riego del campo de golf se ha realizado con agua depurada de la E.D.A.R. de la ciudad de Las Palmas de Gran Canaria desde 1976 (Figura 1).

El flujo subterráneo en la zona de estudio tiene lugar de cumbre a costa, siguiendo el esquema general para la isla. La piezometría permite identificar la existencia de un camino preferencial por el Barranco de Las Goteras y de una línea de flujo entre el campo de golf y dicho barranco. El nivel piezométrico se sitúa a unos 250 m por debajo del campo de golf y a unos 100 m del fondo de la Caldera (Estévez et al., 2012) (Figura 1).

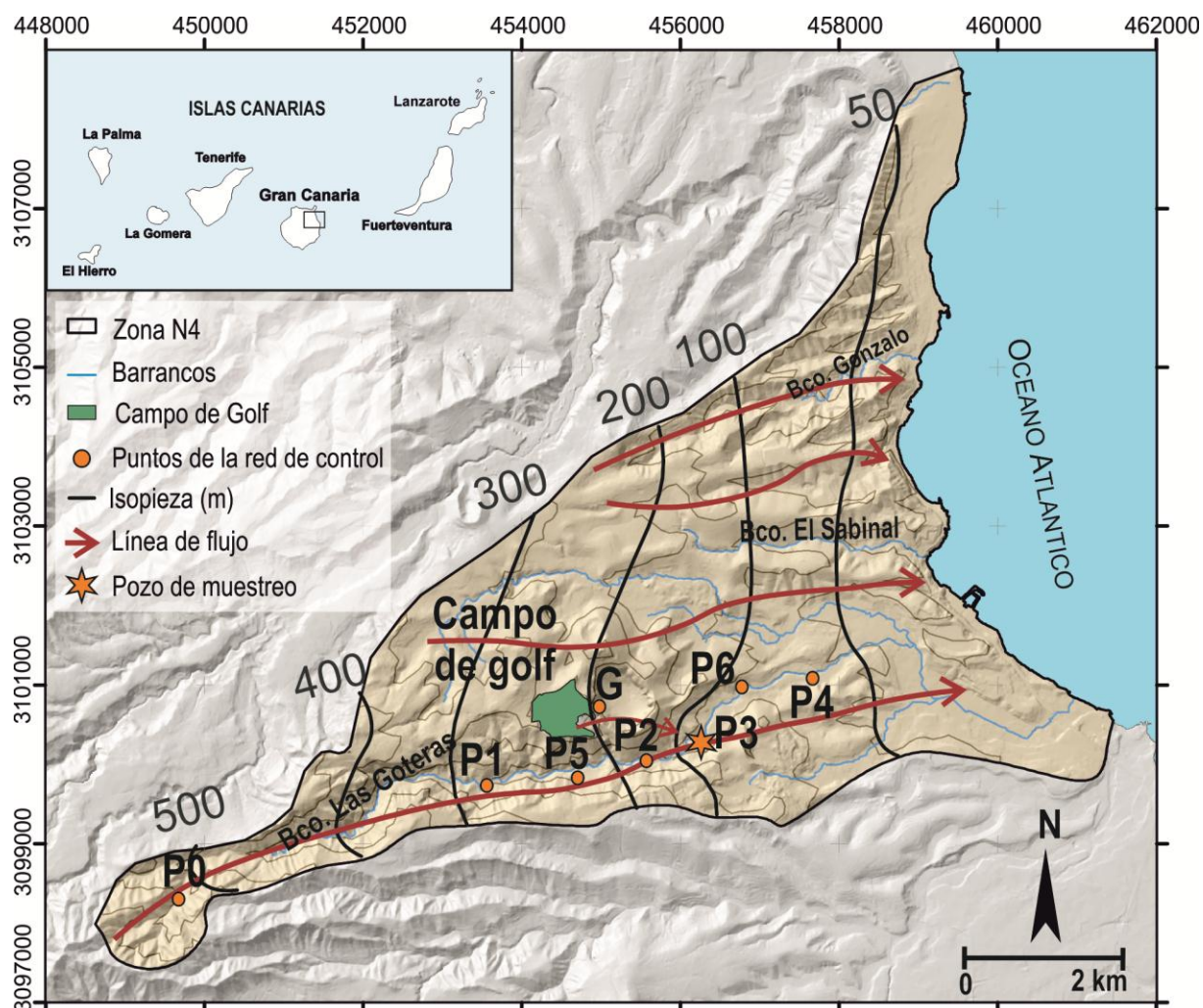


Figura 1. Localización del área de estudio. Se indican los puntos de muestreo pertenecientes a la red de control trimestral para la determinación de contaminantes emergentes y la piezometría de la Cuenca de Las Goteras.

En la zona se instaló una red de control que se muestreó trimestralmente durante 2009 para la determinación de contaminantes emergentes seleccionados (Montesdeoca-Esponda et al., 2014b).

La situación de los puntos de agua subterránea pertenecientes a la red de control se recoge en la Figura 1. Se trata de pozos tradicionales canarios, con diámetros entre 2,5 y 3 m, profundidades entre 15 y 300 m y caudales medios diarios inferiores a 1 Ls^{-1} . Se ha muestreado también una galería de agua de unos 40 m de profundidad situada en la pared de la Caldera de Bandama, a unos 60 m por debajo del campo de golf. La galería drena un acuífero colgado, con un caudal constante de unos $0,05 \text{ Ls}^{-1}$ e integra el agua de los retornos de riego del campo de golf de Bandama.

Análisis Microbiológicos

Se tomaron cuatro muestras de agua: agua de riego, lixiviado del suelo, galería de agua y pozo. El agua de riego se tomó directamente en una toma del campo de golf, el lixiviado del suelo se tomó en un lisímetro instalado en el mismo campo de golf, el agua de la galería se tomó de un estanque en que se almacena el agua y el agua de pozo se muestreó después de un bombeo suficientemente prolongado para evitar el estancamiento. Las muestras se conservaron en nevera y se trasladaron al laboratorio antes de cuatro horas. Cada muestra se dividió en dos partes. La primera se centrifugó para sedimentar los posibles microorganismos y el sedimento se sembró en diferentes medios (Agar Brain-Heart; Agar Cled, Agar McConkey, Agar *Salmonella-Shigella*, Agar con Sal y Manitol y Agar Verde Brillante). Cincuenta mililitros de la segunda parte se añadieron a 50 mL de Caldo Brain-Heart y se resembraron posteriormente en los medios descritos. Todos los medios se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se llevó a cabo la tinción de Gram. Los cocos Gram positivos se identificaron mediante presencia /ausencia de catalasa y, si procede, de coagulasa. En el caso de los Bacilos Gram negativos, se llevó a cabo la prueba de la oxidasa y se identificaron mediante los sistemas API 20E y 20NE (BioMerieux, Francia).

El estudio de la sensibilidad a antibióticos se llevó a cabo mediante antibiograma en medio de Müeller-Hinton. Los antibióticos utilizados para Gram positivas fueron: Ciprofloxacina (CIP), Enrofloxacin (ENRO), Levofloxacin (LEVO), Norfloxacin (NOR), Penicilina (P), Ampicilina (AM), Vancomicina (VAN) y Teicoplanina (TE). Para los Bacilos Gram negativos, los antibióticos ensayados fueron: Ciprofloxacina, Enrofloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin, Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Cefuroxima (CXM) y Amoxicilina + Ácido Clavulánico (AMOX/CLAV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los estudios de identificación y sensibilidad a antibióticos se muestran en las Tablas 1 y 2.

En la siembra directa se detectaron numerosas colonias en los diversos medios para el agua de riego y solución de agua del suelo (tomado en el lisímetro). El crecimiento en la siembra directa de agua de galería fue escaso, y no hubo crecimiento en ninguno de los medios cuando se sembró agua de pozo. Al realizar un enriquecimiento en Caldo BHI durante 24 horas, y llevar a cabo una resiembra posterior, se observaron numerosas colonias en todos los medios y en todas las muestras.

Se aislaron dos géneros de Gram positivos (*Enterococcus* y *Staphylococcus*) (Tabla 1). En general presentan una sensibilidad alta a antibióticos. Dentro de las bacterias Gram positivas de interés clínico aisladas, las cepas R1 y G1 pertenecen al género *Enterococcus* y las cepas G7, G8 y G9 pertenecen al género *Staphylococcus*. Destaca la presencia en agua de riego de una cepa de *Enterococcus* resistente a todas las quinolonas ensayadas. Las restantes cepas bacterianas no se incluyen inicialmente en los géneros aislados en muestras clínicas.

Los bacilos Gram negativos (Tabla 2) se identificaron mediante los sistemas API 20E y 20NE (BioMerieux, Francia). Encontramos diversos géneros de Enterobacterias (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Proteus* y *Serratia*) así como bacterias pertenecientes a otras Familias (*Vibrio* y *Pseudomonas*).

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de los bacilos Gram positivos aislados.

Cepa	Género	CIP	ENRO	LEVO	NOR	P	AM	VAN	TE
G1	<i>Enterococcus</i>	R	R	S	I	S	S	S	S
G2	NI	S	S	S	I	R	R	S	S
G7	<i>Staphylococcus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
G8	<i>Staphylococcus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
G9	<i>Staphylococcus</i>	S	S	S	S	R	R	S	S
P1	NI	S	S	S	S	R	R	S	S
P2	NI	S	S	S	S	R	R	S	S
R1	<i>Enterococcus</i>	R	R	R	R	S	S	S	S

G = Agua de Galería.

L = Agua de Lisímetro.

P = Agua de Pozo.

R = Agua de Riego

S= sensible

R= resistente

I= intermedio

NI: identificación insuficiente con las técnicas empleadas

En cuanto a la sensibilidad a antibióticos, aparece un elevado porcentaje de cepas resistentes a la combinación Amoxicilina + Ácido Clavulánico (12 de 18 incluyendo las de sensibilidad intermedia, 66,6%), lo que puede deberse a su uso frecuente en la población.

Los resultados de los muestreos de contaminantes emergentes revelaron la presencia de todos los analitos seleccionados en concentraciones entre 15 y 150 ng·L⁻¹, a excepción de la permetrina. Los compuestos más frecuentemente encontrados fueron nicotina y cafeína, con concentraciones de hasta 150 ng·L⁻¹ y de manera constante durante todo el año. Atenolol y paraxantina también fueron detectados en todos los muestreos pero en menores concentraciones. Metamizol y fluoxetina sólo se detectaron de manera puntual (Montesdeoca-Esponda et al., 2014b)

Otros estudios realizados en aguas subterráneas han demostrado la presencia de concentraciones relevantes de contaminantes emergentes en muestras ambientales de agua: entre 10 y 100 ng·L⁻¹ (sulfonamidas, trimetoprim, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos y cafeína) (Batt y Aga, 2005), 54 ng·L⁻¹ (quinolonas y penicilinas) (Pozo *et al.*, 2006) y entre 46 y 215 ng·L⁻¹ (sulfonamidas) (Batt et al., 2006). Estévez et al., 2012 procedieron en esta misma zona de estudio a la determinación de 183 compuestos en agua de riego regenerada y agua subterránea de la zona, de los que se detectaron un 43%: 42 productos farmacéuticos, 20 pesticidas, 12 hidrocarburos poliaromáticos, 2 volátiles orgánicos y 2 retardantes de llama. Los compuestos más frecuentes fueron cafeína, nicotina, clorpirifos etil, fluoreno, fenantreno y pireno.

Tabla 2. Estudio de sensibilidad de los bacilos Gram negativos aislados.

Cepa	Especie	CIP	ENRO	LEVO	NOR	CAZ	CTX	CXM	AMOX/ CLAV
G3	<i>Pseudomonas (Flavibacterium) oryzihabitans</i>	S	S	S	S	S	S	R	S
G4	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
G5	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
G6	<i>Enterobacter sakazakii</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
L1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	S	S	S	I	R	R
L2	<i>Proteus mirabilis</i>	S	R	S	S	S	I	R	R
L3	<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
L4	<i>Serratia marcescens</i>	S	S	S	S	S	S	R	R
L5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	S	S	S	I	R	R
L6	<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
P3	<i>Vibrio metschnikovii</i>	S	R	S	I	S	S	S	R
P4	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	I	S	S	S	R
P5	<i>Vibrio metschnikovii</i>	I	R	S	I	S	S	S	R
R2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	S	S	S	I	R	I
R3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	I	I	S	S	S	I	I	I
R4	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	S	S	S	S	S	I	S	S
R5	<i>Enterobacter sakazakii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
R6	BNF	S	S	S	S	S	S	S	S

G = Agua de Galería.

L = Agua de Lisímetro.

P = Agua de Pozo.

R = Agua de Riego

S= sensible

R= resistente

I= intermedio

BNF: bacilo no fermentador, identificación insuficiente con las técnicas empleadas

En los estudios realizados en la zona (Estévez et al., 2012; Montesdeoca-Esponda et al., 2014b), se indica que no es posible establecer un origen unívoco de los contaminantes emergentes en el acuífero a partir de la reutilización de aguas regeneradas, toda vez que las aguas subterráneas integran aguas procedentes de varios orígenes, como las fosas sépticas situadas a lo largo del barranco, las roturas en la red de saneamiento y los retornos de riego con aguas regeneradas en pequeñas explotaciones agrícolas de la zona. No se ha observado correlación entre la presencia de contaminantes emergentes y resistencia a antibióticos. Sin embargo, consideramos destacable la presencia de *Enterococcus*

resistentes a quinolonas en muestras ambientales de agua así como el elevado número (12 de 18) de Bacilos Gram negativos resistentes a Amoxicilina + ácido Clavulánico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se enmarca en el Programa CONSOLIDER-TRAGUA (CSD2006-00044) y ha sido financiado en parte por las Redes de Excelencia de la ULPGC a través de la Acción Incipiente "Presencia de contaminantes emergentes en aguas regeneradas y subterráneas de la isla de gran canaria y su relación con la resistencia bacteriana. Taxonomía/clasificación de aguas usando redes neuronales artificiales". Se agradece su apoyo al Real Club de Golf de Las Palmas y a los propietarios de los pozos y la galería.

REFERENCIAS

- Batt, A.L. y Aga, D.S. (2005). *Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination*. Analytical Chemistry 77: 2940-2947.
- Batt, A.L.; Snow, D.D. y Aga, D.S. (2006). *Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA*. Chemosphere, 64: 1963-1971.
- Estévez, E.; Cabrera, M.C.; Molina-Díaz, A.; Robles-Molina, J. y Palacios-Díaz, M.P. (2012). *Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain)*. Science of the Total environment, 433, 538-546.
- Marrero, A. y Palacios, M.P. (1996). *Depuración y reutilización de aguas en Gran Canaria*. Ed. Consorcio Insular de Aprovechamiento de Aguas Depuradas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, 55 pp.
- Montesdeoca-Esponda, S.; Mahugo-Santana, C.; Sosa-Ferrera, Z. y Santana-Rodríguez, J.J. (2014). *A dispersive liquid-liquid micellar microextraction for the determination of pharmaceutical compounds in wastewaters using ultra-high-performance liquid chromatography with DAD detection*. Biomedical Chromatography, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.3282.
- Montesdeoca-Esponda, S.; Estévez, E.; Cabrera, M.C.; Sosa-Ferrera, Z. y Santana-Rodríguez, J.J. (2014). *Determinación de contaminantes emergentes en aguas subterráneas del Noreste de Gran Canaria*. II Workshop "Estudio, aprovechamiento y gestión del agua en terrenos e islas volcánicas" (en prensa)
- Petrovic, M.; Eljarrat, E.; Lopez de Alda, M.J. y Barceló, D. (2004). *Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378: 549-562.
- Pozo, O.J.; Guerrero, C.; Sancho, J.V.; Ibáñez, M.; Pitarch, E.; Hogendoorn, E. y Hernández, F. (2006). *Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 1103: 83-93.
- Pumbwe L., Skilbeck C.A. y Wexler H.M. (2007). *Induction of multiple antibiotic resistance in Bacteroides fragilis by benzene and benzene-derived active compounds of commonly used analgesics, antiseptics and cleaning agents*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60, 1288-1297.