

Formación de biopelículas y susceptibilidad antimicrobiana entre coliformes aislados en agua potable embotellada en Carabobo, Venezuela

Biofilms formation and antimicrobial susceptibility among coliforms isolated in bottled drinking water in Carabobo, Venezuela

Tomás Rojas^{1,2}, Alejandra Montoya², Alejandra Moreno², Ritneybi Mujica² & Ysvette Vásquez³

RESUMEN

Bacterias indicadoras de contaminación tales como bacterias heterótrofas, coliformes totales y termotolerantes fueron enumeradas en agua potable embotellada usando métodos estándar y filtración a través de membrana. El desarrollo de biopelículas y la susceptibilidad antimicrobiana (método de Kirby-Bauer) fueron evaluados sobre sesenta aislados de coliformes seleccionados de forma aleatoria. De 50 muestras, en un elevado porcentaje (94), se observó niveles de bacterias heterotróficas por encima de 100 UFC/mL de agua, 38 % presentó al menos una UFC/100 mL de coliformes totales o termotolerantes, mientras que, 30 % y 28 %, presentaron más de diez UFC/100 mL para ambos indicadores, respectivamente. Las especies de coliformes identificadas en mayor proporción fueron, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca*. Usando un ensayo *in vitro* para detectar la formación de biopelículas se determinó que entre un 75,8 y 79,2 % de los coliformes totales y termotolerantes, respectivamente, fueron descritos como moderados o fuertes formadores de biopelículas. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) con respecto a la capacidad de formación de biopelículas entre los dos grupos. La mayoría de los aislados resultaron susceptibles frente a los antimicrobianos evaluados, únicamente dos especies presentaron fenotipos de resistencia no naturales. Perfiles de multiresistencia, típicos de especies asociadas con actividades clínicas o veterinarias, fueron identificados en un aislado de *Enterobacter cloacae* (betalactamasas tipo AmpC dereprimida) y un aislado de *Escherichia coli* fue resistente a ampicilina. Este estudio sugiere que el agua potable en botellones plásticos que se expende en algunas áreas urbanas de Carabobo, Venezuela, puede representar un riesgo para la salud.

Palabras claves: Agua potable, Coliformes, Biopelículas, Susceptibilidad antimicrobiana.

SUMMARY

Pollution indicator bacteria such as heterotrophic bacteria, total and thermotolerant coliforms were quantified in bottled drinking water using standard method and membrane filter procedure. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility (Kirby-Bauer method) were tested on sixty randomly selected coliform strains. Among 50 water samples, a large percentage (94) were found with heterotrophic bacteria levels above 100 CFU/mL, 46 % showed at least one CFU/100 mL of thermotolerant or total coliforms whereas 28 % and 30 % showed more than ten CFU/100 mL for both indicators. Coliform species found in higher proportion were, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. Using an "in vitro" assay for biofilms formation it was determined that between 75.8 y 79.2 % of total and thermotolerant coliforms, respectively, were found to be moderate or strong biofilm formers. There were no significant differences ($P > 0.05$) between both groups regarding the capacity for biofilm formation. Most of the isolates were susceptible against the antibiotics tested and only two species showed unnatural resistance phenotypes. Multiresistance profiles, typical of strains associated with human clinical or veterinary activities were identified in one *Enterobacter cloacae* isolated (de-repressed AmpC beta-lactamases) and one *Escherichia coli* strain was ampicillin resistant. This study suggests that the water sold in some plastic bottles in some urban areas near by Carabobo, Venezuela, may be a risk to health.

Key words: Drinking Water, Coliforms, Biofilms, Antimicrobial susceptibility

¹ Departamento de Microbiología/Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia- Venezuela.

² Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia-Venezuela.

³ Hospital Estatal "Los Samanes"- CORPOSALUD-Maracay-Edo Aragua-Venezuela

*Autor de correspondencia: trojas@uc.edu.ve

INTRODUCCIÓN

La cuantificación de microorganismos indicadores, entre ellos, bacterias heterótrofas, coliformes fecales y coliformes termoresistentes, ha sido utilizada como referente para determinar la higiene del agua y alimentos en general. Permiten evaluar la calidad sanitaria por cuanto proveen información sobre las prácticas higiénicas aplicadas en la manufactura y procesamiento e indican posible contaminación fecal, por lo que un incremento en su número, alerta sobre la posible presencia de microorganismos patógenos (Pathak & Gopal, 2008).

En los últimos años ha existido un marcado interés por entender las implicaciones de estos grupos bacterianos, no sólo como indicadores de calidad sanitaria sino como agentes que por sí mismos son una amenaza potencial para la salud pública, por cuanto pueden acarrear factores de virulencia y mecanismos de resistencia (De Meirelles *et al.*, 2002; Juhna *et al.*, 2007). A título ilustrativo, podemos mencionar los grupos enterovirulentos de *Escherichia coli* los cuales están dispersos en el ambiente pudiendo contaminar cuerpos de agua y por ende ser transmitidos a la comunidad a través del agua de consumo o vegetales frescos irrigados con ésta (Koo *et al.*, 2008). Así mismo, se han descrito incidentes con aislados toxigénicos de *Klebsiella oxytoca* un miembro importante del grupo coliformes y que, en ocasiones, puede producir colitis hemorrágica (Smith *et al.*, 2009).

Otro aspecto relevante de este grupo, es su capacidad de resistencia antimicrobiana y el potencial de transferirla genéticamente entre ellos y géneros relacionados. Podemos mencionar mecanismos de resistencia de cierto espectro tales como la producción de betalactamasas del tipo TEM 1, TEM 2, SHV-1. Sin embargo, los mecanismos de multiresistencia, brindan, a estos grupos bacterianos un margen de maniobra más amplio para enfrentar el desafío de la terapia antibiótica. Destacan la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), enzimas derivadas, por mutación, de las TEM, SHV y CTX-M y que son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, las cuales son codificadas por genes plasmídicos con alta tasa de transferencia (Paterson & Bonomo, 2005; Biendo *et al.*, 2008). Betalactamasas tipo AmpC quienes confieren resistencia a un amplio

rango de betalactámicos y se encuentran presentes de forma natural (genes cromosómicos inducibles o constitutivos) en *Enterobacter* spp., pudiéndose transferir a otros géneros, en especial *Klebsiella* spp., a través de elementos plasmídicos (Martínez, 2009). Carbapenemasas que confieren resistencia frente a carbapenemas, distinguiéndose las que poseen serina en su centro activo y las metalo-betalactamasas que requieren zinc para su función. La presencia de estas enzimas ha sido demostrada en aislados de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. (Famiglietti *et al.*, 2005).

Sumado a la presencia de genes de virulencia y de resistencia, otro elemento de importancia que se debe considerar dentro del grupo coliformes es su capacidad para la formación de biopelículas. En este sentido, existe una tendencia, en distintos grupos bacterianos, de formar comunidades relativamente estables a través de la producción de una matriz exopolisacárida y en ocasiones otro tipo de compuestos poliméricos, que les permiten su adherencia a distintas superficies en especial plásticas y metálicas (Burmolle *et al.*, 2006). Dichas comunidades bajo estas condiciones adquieren ciertas ventajas para su supervivencia, pudiendo entrar en periodos de latencia con disminución de su tasa metabólica, se hacen resistentes a desinfectantes y antimicrobianos en general y aumenta su supervivencia en condiciones de desecación. Así mismo, se incrementa la posibilidad de interacción de los distintos géneros y especies, particularmente entre patógenos y oportunistas, con la posibilidad de transferencia genética horizontal, tanto de mecanismos de virulencia como de resistencia, los cuales, se describieron con anterioridad (Rodríguez & Pascual, 2008).

Ante la creciente exposición de cuerpos de aguas a la contaminación microbiológica debido al incremento de descargas producto de la actividad humana es probable que el agua para consumo proveniente de estas fuentes, de no ser tratada adecuadamente, represente un riesgo potencial. Si a esto le sumamos la presencia, dentro de estos contaminantes, de bacterias portadoras de resistencia y genes de virulencia, dado el uso indiscriminado de antibióticos en las actividades clínicas y veterinarias, el análisis de la potencialidad del agua de consumo como vehículo de grupos bacterianos, con estas características, se hace importante. En función de este planteamiento, en el presente estudio, se

evaluó la capacidad de formación de biopelículas y se determinaron los patrones de susceptibilidad antimicrobiana en un grupo de especies del grupo coliformes, aisladas a partir de agua potable embotellada distribuida en comunidades populares pertenecientes al Municipio Libertador del Estado Carabobo, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de agua potable

El estudio se realizó en comunidades pertenecientes al Municipio Libertador (Tocuyito) del Estado Carabobo, Venezuela (10° 06' 52'' N, 68° 03' 56'' W). Se seleccionaron dos urbanismos con una población estimada en 800 habitantes consolidados en hogares en su mayoría de los estratos socioeconómicos III y IV según la escala de Graffar-Méndez Castellanos (Méndez & de Méndez, 1986). Dichos estratos se caracterizan por consumir preferentemente agua potable embotellada que agua distribuida por la red hidrológica estatal. Se efectuó una selección aleatoria de 50 viviendas para posteriormente solicitar por escrito, a cada familia, su participación consentida en el proyecto. En cada hogar, a partir de botellones de agua potable de 20 L de capacidad se tomaron en condiciones asépticas, dos muestras de 250 mL c/u las cuales se depositaron en frascos estériles conteniendo tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10 %) para la cuantificación microbiológica y en frascos sin aditivo para la determinación de parámetros físico-químicos. Se procesaron 5 muestras semanales por un período de diez semanas para un total de 50 unidades para análisis microbiológico y 2 muestras semanales para ensayos físico-químicos para totalizar 20 unidades. Todas las muestras se trasladaron al laboratorio en cavas refrigeradas y procesadas en un tiempo no mayor a 2 horas.

Análisis físico-químico

El análisis físico-químico se realizó según lo indicado por Standard methods of examination of water (APHA, 1998) determinando: pH por el método potenciométrico (pH 510-Series, OAKTON Instruments, Vermon, USA), alcalinidad total (mg/L CaCO_3) por volumetría ácido-base, dureza total/dureza cálcica (mg/L CaCO_3) por volumetría complejométrica con EDTA y cloruros (mg/L) por volumetría con AgNO_3 .

Cuantificación de microorganismos indicadores

La cuantificación de microorganismos indicadores incluyó la determinación de bacterias heterótrofas (BH), coliformes totales (CT) y coliformes termotolerantes (CTT). El recuento de BH se realizó según la metodología indicada por la APHA (1998) y se expresó en UFC/mL. El recuento de CT y CTT se efectuó por la técnica de filtración a través de membrana. Brevemente, 100 mL de cada muestra y por duplicado se filtraron a través de una membrana de celulosa de uso microbiológico de 0,45 μm de diámetro de poro, depositándose luego cada membrana sobre placas de agar bilis rojo violeta (ABRV), incubándose a 35°C y 44,5°C por 24 horas para la detección de CT y CTT respectivamente. Todos los recuentos se expresaron en números de unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 mL de muestra. Realizado el conteo en cada placa, se procedió a una selección aleatoria de cinco colonias típicas tanto para coliformes totales como para termotolerantes destinada a la conformación de una bacteriotea (los aislados fueron mantenidos en agar cerebro corazón semisólido (ACC) hasta su selección y posterior identificación). De esta bacteriotea se seleccionaron de forma aleatoria 30 aislados por cada grupo de coliformes, estos fueron reaislados en agar Endo y posteriormente se les realizó: identificación fenotípica aplicando la sistemática descrita para *Enterobacteriaceae* según Winn *et al.* (2008), evaluación de su capacidad para formación de biopelículas y estudio de la susceptibilidad frente a los antimicrobianos.

Determinación de formación de biopelículas

La determinación de formación de biopelículas se efectuó mediante un ensayo en microplacas de poliestireno (90 pozos) descrito por Al-Shuneigat *et al.* (2005). Se preparó un inóculo de cada aislado depositando una asada en caldo soya tripticasa (CST) el cual se incubó durante 18 horas a 35 °C para CT y 44,5 °C para CTT. A partir de este cultivo se ajustó una suspensión bacteriana en CST fresco comparando, por espectrofotometría, su densidad óptica a la de un patrón de McFarland N°: 0,5 (Espectrofotómetro Jenwey 6405, Bibby Scientific, Ltd, Dunmow, Reino Unido). Ajustado el inóculo, se procedió a servir en cada pozo 20 μL de dicha suspensión más 180 μL de CST con glucosa al

0,25% (dilución 1:100) para luego incubar en cámara húmeda por 48 horas a 35°C ó 44,5°C para CT y CTT respectivamente. Pasada la incubación, en cada pozo se realizaron dos lavados con solución buffer fosfato salino estéril (PBS, pH: 7,2) para eliminar las células no adheridas. Luego fueron añadidos 200 µL de solución de cristal violeta al 0,01 % manteniéndose a temperatura ambiente por 30 min para posteriormente realizar dos nuevos lavados con solución PBS. Se adicionó luego, 200 µL de etanol al 95% para solubilizar el colorante adherido a las paredes cuantificándose su densidad óptica como una estimación de la capacidad de formación de biopelículas, la medición se realizó a 490 nm utilizando un lector de ELISA (2100-C, Optic-Ivymen System, Biotech). Cada aislado se evaluó por cuadruplicado y los ensayos se repitieron en tres ocasiones, incluyendo en cada ensayo cuatro pozos controles sin inocular y cuatro pozos controles con aislados conocidos por sus distintas capacidades de formación de biopelículas. La clasificación de cada aislado, en cuanto a su capacidad para formación de biopelículas, fue hecha usando el esquema descrito por Chaves *et al.* (2007) tal como sigue: se tomó la lectura promedio de densidad óptica (DO) de los pozos controles sin inocular (DOc), considerándose el cutoff como el valor de tres desviaciones estandar (DE) de esta media. Los aislados fueron clasificados como débilmente formadores de biopelículas (DFB) cuando su $DO \leq 2XDOc$, moderadamente formadores de biopelículas (MFB) cuando: $2XDOc \geq DO \leq 4XDOc$ y fuertemente formadores de biopelículas (FFB) cuando su $DO \geq 4XDOc$.

Evaluación de la susceptibilidad frente a los antimicrobianos

La susceptibilidad frente a los antimicrobianos fue determinada por ensayos de difusión en discos (Kirby-Bauer) de acuerdo a la metodología descrita por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011). Los antibióticos evaluados fueron: amoxicilina/clavulánico (AMC: 20/10 µg), ceftazidima (CAZ: 30 µg), cefotaxima (CTX: 30 µg), ceftriaxona (CRO: 30 µg), imipenem (IPM: 10 µg), meropenem (MEM: 10 µg), piperacilina/tazobactan (PTZ: 100/10 µg), cefoxitina (FOX: 30 µg), ciprofloxacina (CIP: 5 µg), ácido nalidixico (AN: 30 µg), amikacina (AMK: 30 µg), cefotaxima/clavulánico (CTX/CLA: 30/10

µg), ceftazidime/clavulánico (CAZ/CLA: 30/10 µg), trimetoprin/sulfametoxazol (STX: 1,25/23,75 µg), aztreonam (ATM: 30 µg), ampicilina (AMP: 10 µg), EDTA/tioglicolato sódico (por disco: 10 µL de 2 vol. de sol. EDTA 0,5 M y 3 vol de sol Tioglicolato sódico 300 mg/mL). La posición de los discos se realizó considerando su ubicación estratégica sobre la placa de agar Mueller-Hinton para la detección fenotípica de aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), betalactamasas tipo AmpC y carbapenemasas, según lo descrito por Famiglietti *et al.* (2005). Brevemente, para la detección de BLEEs se usó el ensayo de sinergia de doble disco (ESDD) para lo cual se ubicaron sobre la placa, el disco de amoxicilina /ácido clavulánico y a una distancia de 20 mm con respecto a éste, se posicionaron discos de CTX, CRO, CAZ y ATM. El aumento de la zona de inhibición entre el disco de AMC y al menos uno de los discos adyacentes sería indicativo de BLEEs. Para la detección de AmpC y carbapenemasas, se ubicaron discos de CAZ y PTZ equidistantes a IPM y discos de PTZ y CTX adyacentes a MEM. La aparición de achatamiento entre CAZ y IPM o aumento de halo entre PTZ e IPM o MEM sería indicativo de la producción de AmpC inducibles o carbapenemasas tipo 2f respectivamente. La presencia de metalo-carbapenemasas se distinguió por el posicionamiento del disco de EDTA contiguo a MEM, considerándose positivo para este fenotipo si se produce un incremento del halo entre ambos discos.

Análisis de los datos

Los resultados de los análisis se compararon con los requisitos microbiológicos y fisicoquímicos establecidos para agua potable en las “Normas Sanitarias de Calidad del Agua Potable” (Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 36.395, 1998), mediante un análisis descriptivo basado en el cálculo de promedio y desviación estándar. Para la comparación entre la formación de biopelículas entre coliformes totales y termotolerantes se realizó una prueba t de student con un nivel de confianza del 95 %. Para la asociación de las variables entre la formación de biopelículas y resistencia antimicrobiana se aplicó chi-cuadrado (χ^2) de Pearson con un nivel de significancia del 95 % y el coeficiente de Spearman. (Paquete estadístico Staphgraph versión 2.0).

RESULTADOS

Calidad microbiológica

La calidad bacteriológica de las muestras analizadas, en función de la concentración (UFC/volumen) de bacterias indicadoras de calidad sanitaria, se presenta en la Fig. 1. Del total de muestras (n=50), el 94 % presentó recuentos de más de 100 UFC/mL en cuanto a la población heterotrófica, mientras que para CT y CTT, un 58 % y 48 % respectivamente, presentó índices de al menos 1 UFC/100 mL. Entre un 36 % y 32 % se ubicó el porcentaje de muestras que con niveles superiores a 10 UFC/100 mL para coliformes totales y termotolerantes respectivamente. Entre las especies identificadas (Tabla I), *Klebsiella pneumoniae* resultó el microorganismo con el mayor número de aislamientos, para ambos grupos, con un 23,3 % para CT y 40 % para CTT, seguido por *Enterobacter cloacae* con 23,3 % para CT y 16,6 % para CTT. Otros aislamientos de importancia fueron: *Enterobacter aerogenes* (10 % para CT y 20 % para CTT) y en menor proporción se caracterizaron especies, tales como: *Escherichia coli* y miembros del complejo *Pantoea agglomerans*, entre otros.

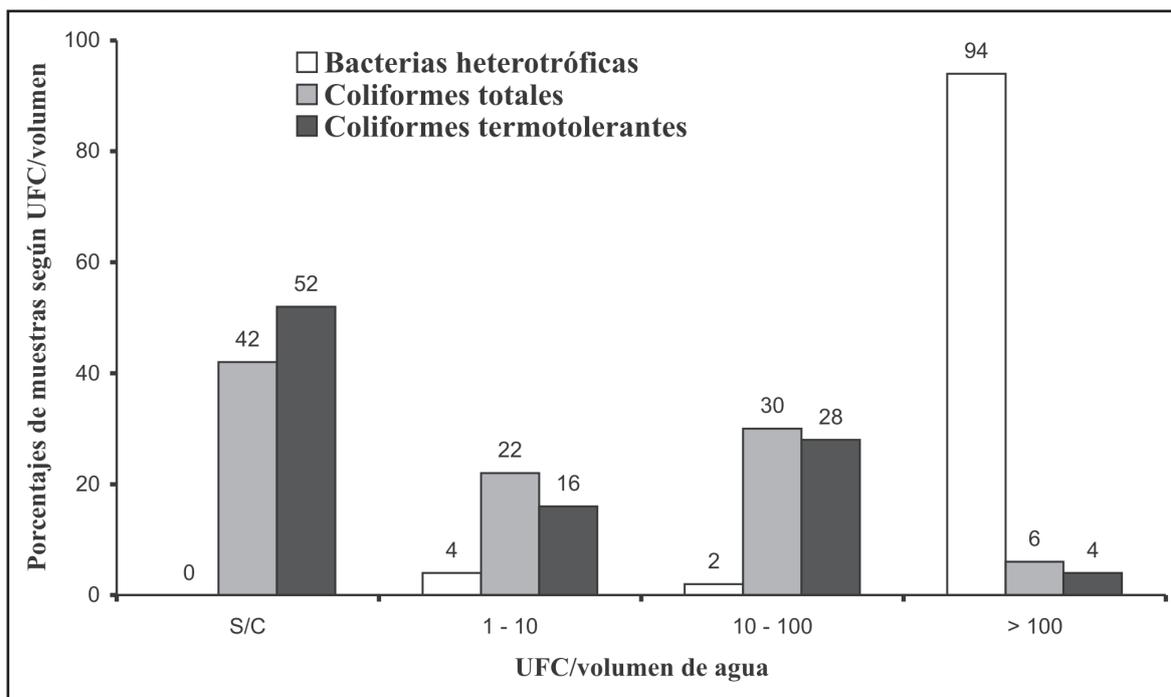
Características físico-químicas

Los valores medios y la desviación estándar de los análisis físico-químicos (datos no tabulados) de las 20 unidades analizadas fueron los siguientes: pH ($6,54 \pm 0,47$); alcalinidad total ($52,5 \pm 51,2$ mg/L); dureza total ($260,1 \pm 87,3$ mg/L); cloruros ($241,6 \pm 133,5$ mg/L). Alrededor del 50 % de las muestras analizadas presentaban al menos un parámetro físico químico fuera de especificación según Gaceta Oficial N°: 36395 (1998).

Capacidad de formación de biopelículas

Un porcentaje significativo de los aislados, en ambos grupos, demostró capacidad, entre moderada y fuerte para la producción de biopelículas (Fig. 2). Del total de aislados de coliformes totales, el 50,0 % se distinguió como moderadamente formador de biopelículas y un 29,2 % demostró una fuerte capacidad hacia el agregado en matriz polimérica. En cuanto al grupo termotolerante, un 65,5 % de las especies fueron catalogadas como moderadamente formadoras, mientras que el 10,3 % presentó tendencia a originar una adherencia fuerte

Fig. 1. Calidad bacteriológica de muestras de agua según la concentración (UFC/Volumen) del grupo indicador.

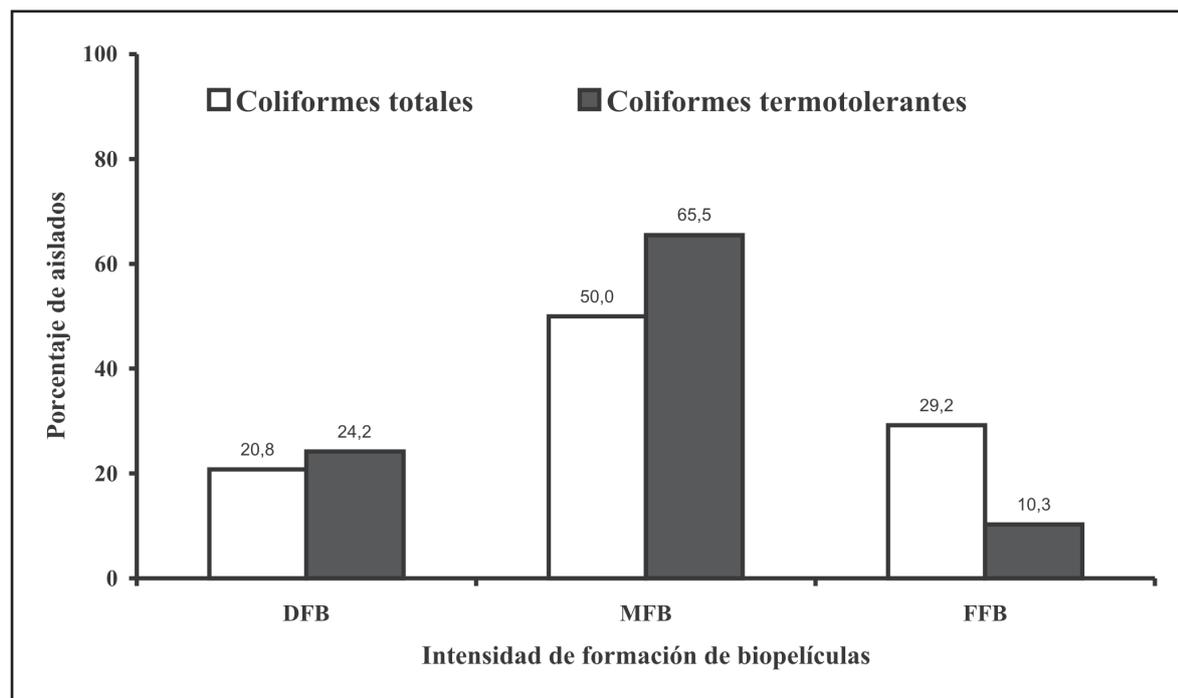


Bacterias heterotrófica expresadas en UFC/mL, coliformes totales y termotolerantes expresados en UFC/100 mL, S/C: sin crecimiento

Tabla I. Identificación según género y especie de los aislamientos seleccionados de forma aleatoria entre coliformes totales y termotolerantes.

Caracterización fenotípica	Grupo Indicador			
	Coliformes totales (n=30)		Coliformes termotolerantes (n=30)	
	N° aislados	%	N° aislados	%
Complejo <i>Pantoea agglomerans</i>	4	13,3	2	6,6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	10,0	6	20
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	23,3	5	16,6
<i>Escherichia coli</i>	5	16,6	2	6,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	23,3	12	40
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	6,6	2	6,6
<i>Klebsiella ozaenae</i>	2	6,6	1	3,3
Total aislamientos	30	100,0	30	100,0

Fig. 2. Porcentaje de aislados del grupo coliformes discriminados según la capacidad de producción de biopelículas.



DFB= Debilmente formador de biopelículas, MFB= Moderadamente formador de biopelículas, FFB= Fuertemente formador de biopelículas.

Tabla II. Susceptibilidad antimicrobiana entre especies de coliformes totales y termotolerantes provenientes de muestras de agua potable.

Antibiótico evaluado	Especies de coliformes													
	<i>C. P. agglomerans</i>		<i>E. aerogenes</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>E. coli</i>		<i>K. oxytoca</i>		<i>K. ozaenae</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	CT	CTT	CT	CTT	CT	CTT	CT	CTT	CT	CTT	CT	CTT	CT	CTT
CRO	0/4*	0/2	0/3	0/6	0/7	1 _a /5 [†]	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
AMC	4/4	2/2	3/3	6/6	7/7	5/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
CAZ	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	1 _a /5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
IPM	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
PTZ	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	1 _a /5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
MEM	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
FOX	4/4	2/2	3/3	6/6	7/7	5/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
AMP	4/4	2/2	3/3	6/6	7/7	5/5	1 _b /5	0/2	2/2	2/2	2/2	1/1	7/7	12/12
STX	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
AN	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
CAZ/CLA	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
CIP	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
ATM	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	1 _a /5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
NA	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
CTX/CLA	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
AMK	0/4	0/2	0/3	0/6	0/7	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/7	0/12
BLEE _s	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
AmpC Inducible	MN	MN	MN	MN	MN	MN	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
AmpC derreprimido	NP	NP	NP	NP	NP	P (1 _a)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Carbapene-masas	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

CT= Coliformes totales, CTT= Coliformes termotolerantes, n/N* = N° de aislados resistentes / N° de aislados totales de esa especie.

Numero en el numerador con letra en subíndice = resistencia adquirida para ese antibiótico, NP= No presente, P= presente, MN= Mecanismo natural en esa especie, †Igual letra en subíndice (Ej. 1_a) = el mismo aislado presenta resistencia adquirida frente a esos antimicrobianos.

a la superficie de poliestireno. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en cuanto a la capacidad de formación de biopelículas entre coliformes totales y termotolerantes.

Susceptibilidad antimicrobiana

Los patrones de susceptibilidad frente a los antimicrobianos terapéuticos indicados para *Enterobacteriaceae* oportunistas se presentan en la Tabla II. Un porcentaje significativo de los aislamientos (96,7%) resultó sensible, "in vitro", frente a la totalidad de los quimioterápicos evaluados. Sólo se expresó de

forma particular, en algunos géneros, sus mecanismos de resistencia naturales, tal es el caso de *Enterobacter* spp. con resistencia natural a FOX, AMP, AMC y producción de betalactamasas tipo AmpC inducible, así como *Klebsiella* spp. que expresó su resistencia natural a AMP. No fue demostrada la expresión de mecanismos de resistencia ampliados tales como, beta lactamasas de espectro extendido, así como también, serino o metalo carbapenemasas. Sin embargo, en el grupo de coliformes termotolerantes un aislado de *Enterobacter cloacae* manifestó un patrón fenotípico de resistencia ampliada del tipo AmpC derreprimida (sobre este aislado se probó su susceptibilidad frente

a cefepime resultando sensible) y un aislamiento de *Escherichia coli* con resistencia a AMP. Estos aislados representan escasamente un 6,6 % del total de aislados del grupo termotolerante, lo que significa, que no hubo diferencia significativa ($P>0,05$) entre los niveles de resistencia antimicrobiana al comparar ambos grupos. Al no hallarse multiresistencia entre los aislamientos analizados no se pudo dilucidar alguna relación entre la capacidad de formación de biopelículas y los patrones de resistencia.

DISCUSIÓN

Según la normativa actual venezolana sobre calidad de agua (Gaceta Oficial N° 36.395, 1998), un porcentaje importante de las muestras analizadas no cumple con los parámetros exigidos para ser considerada inocua para la salud del consumidor. En al menos un 48 % de las muestras se halló niveles de coliformes por encima de 1 UFC/100 mL de agua, de este porcentaje una cantidad significativa presentó niveles superiores a las 10 UFC/100 mL. En el caso de las bacterias heterótrofas, un 94 % de las muestras estuvo fuera de especificación, además que, un número importante de muestras presentaron parámetros físico químicos inadecuados según la normativa. La presencia de coliformes y población heterótrofa en agua de consumo, en general, es posible ante la ausencia de medidas higiénicas rigurosas y deficiencias en la cloración, así mismo, la recontaminación durante su embotellamiento, almacenamiento y distribución juegan un papel importante (Pathak & Gopal, 2008).

La precariedad sanitaria tanto en agua potable envasada como en agua distribuida por la red hidrológica es recurrente en muchos países del ámbito Latinoamericano, Caribeño y países en vías de desarrollo en general. En estudios efectuados en Trinidad y Tobago, un 60 % de las muestras obtenidas de la red hidrológica estatal que sirve a hogares rurales, presentaron índices de calidad sanitaria que las catalogan como no aptas para el consumo (Welch *et al.*, 2000). En Brasil, en dos estudios independientes, uno hecho sobre agua envasada en recipientes plásticos y otro referido a la red pública, entre un 25% y 62,5%, respectivamente, de las muestras presentaron parámetros de calidad considerados como inaceptables (Nogueira *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2010). En países Africanos, por ejemplo Gana, la calidad sanitaria del agua envasada para consumo, no logró los requisitos mínimos de

aceptabilidad, en al menos el 45% de las muestras analizadas en un estudio local (Obiri *et al.*, 2003). Dos estudios efectuados en Asia, reflejan porcentajes de contaminación en muestras de agua potable en rangos que oscilan entre 20% y 90%, incluso en la mayoría se hallaron niveles de coliformes termotolerantes por encima de las 10 UFC/100 mL (Sirajul *et al.*, 2007; Pathak & Gopal, 2008). Esto plantea un desafío importante, tanto para autoridades como para la sociedad en general, para lograr agua de óptima calidad si se quiere avanzar en las metas fundamentales del milenio propuestas por la OMS (WHO, 2011).

En el presente estudio se aislaron especies tales como: *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *K. oxytoca*, siendo descritos como agentes oportunistas y muchos de ellos pueden acarrear resistencia múltiple frente a los antimicrobianos (Horcajada *et al.*, 2006). En relación con *E. coli*, es importante señalar, que existen patotipos enterovirulentos que aún estando en bajo número representan un peligro potencial. Por ejemplo, el grupo enterohemorrágico, donde destaca el serotipo O157:H7, se transmite por agua y causa trastornos severos como el síndrome urémico hemolítico. Están además, el grupo enterotoxigénico causante de cuadros agudos de diarrea acuosa, los grupos enterovirulentos y enteropatógenos que producen cuadros diarreicos con lesión histológica considerable y los serotipos enteroagregantes que originan diarreas prolongadas en lactantes (Hunter, 2003; Koo *et al.*, 2008). Así mismo, *K. oxytoca* se reporta como agente causal de cuadros agudos de colitis hemorrágica, presentándose particularmente peligroso en lactantes e individuos inmunocomprometidos. En estos casos, si el paciente consume antibióticos particularmente betalactámicos y está colonizado por alguna especie que porta genes citotóxicos, si ésta resultara resistente al antibiótico, se exagera su crecimiento y produce deterioro masivo de la mucosa (Hoffman *et al.*, 2010).

Entre las especies de coliformes identificadas, un alto número demostró habilidad importante para la producción de biopelículas, ubicándose entre un 75,8% y 79,2% para CT y CTT, respectivamente, los aislados que demostraron capacidad, entre moderada y fuerte, en su producción. Este hallazgo resulta importante por cuanto podría explicar la permanencia de los microorganismos, dentro de la matriz polimérica, por largos periodos de tiempo en los botellones plásticos, inclusive durante los lapsos

en que permanecen sin líquido. De tal modo, que aún en ausencia de agua, el polímero le permitiría a los microorganismos contar con reservas hídricas para su supervivencia, además de, permitirle una disminución de su tasa metabólica entrando en una condición muy particular que se conoce como viable pero no cultivable (De Sousa *et al.*, 2008; Balzer *et al.*, 2010). De no existir una adecuada higienización de los botellones aunado al uso excesivo sin el recambio adecuado, se generarán biopelículas casi permanentes dando la posibilidad de un elevado número de bacterias por cm² de superficie plástica con la consiguiente presencia de microorganismos patógenos. Así mismo, se darían condiciones para la transferencia horizontal de elementos genéticos, entre los distintos grupos bacterianos que conforman la mancomunidad, que dotarían a los descendientes con capacidad de virulencia y/o multiresistencia agregada (Narisawa *et al.*, 2008). De igual modo, se determinó que un porcentaje importante de las muestras presentó parámetros físico-químicos fuera de especificación y en especial la presencia de concentraciones elevadas de carbonato de calcio, lo cual ha sido demostrado, juega un rol importante en la producción y en el mantenimiento de biopelículas incorporándose como un elemento más en su estructura, originando depósitos calcáreos que brindan protección frente a agentes antimicrobianos incluidos el cloro residual (Flemming, 2002; Goode & Allen, 2011).

Los patrones fenotípicos de susceptibilidad antimicrobiana demostrados en la mayoría de las especies evaluadas, salvo dos aislados, reflejaron alta sensibilidad frente a los antimicrobianos recomendados por CLSI (2011), para especies oportunistas de la familia *Enterobacteriaceae*. Algunos géneros presentaron sus patrones fenotípicos de resistencia naturales (codificados cromosómicamente) tal es el caso de la presencia de betalactamasas tipo AmpC inducibles (su expresión se da en presencia de ciertos antibióticos inductores, ejemplo, FOX, CLA, entre otros) en especies de *Enterobacter* spp., así como, la expresión de resistencia hacia AMP por parte de *Klebsiella* spp. En relación con otros mecanismos de resistencia complejos, tales como, la presencia de BLEEs y carbapenemasas no se demostró en las especies evaluadas. Este hallazgo permite inferir, en términos generales, que la contaminación bacteriana del agua viene dada fundamentalmente por microorganismos ambientales, inclusive de posible procedencia animal,

pero que no han sido sometidos a las presiones de la terapia antibiótica. Hay autores que consideran el uso de los patrones de resistencia antimicrobiana como marcadores del grado de contaminación de aguas y alimentos con desechos biológicos antropogénicos o de actividad veterinaria. A medida que aumenta el uso indiscriminado de antibióticos, mayor será la presencia de microorganismos multiresistentes en estos sustratos (De Meirelles *et al.*, 2002; Lachmayr *et al.*, 2009).

Entre las especies aisladas provenientes del grupo de coliformes termotolerantes sólo un aislado de *Escherichia coli* fue resistente a AMP, mientras que, un aislado de *Enterobacter cloacae* mostró patrón fenotípico de multiresistencia no natural, compatible con la producción de betalactamasas tipo AmpC suprimida, caracterizadas éstas, por conferir resistencia frente a todas las penicilinas, combinaciones con inhibidores de betalactamasas (EJ, AMC), cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, así como, monobactámicos (ATM) (Martínez, 2009). Cabe destacar que las enzimas AmpC, cromosómicas o plasmídicas, están codificadas por elementos genéticos que tienen alta tasa de transferencia horizontal hacia especies que carecen de dichos mecanismos, por ejemplo, desde *Enterobacter* spp. hacia especies de *Klebsiella*, *Salmonella* o *Proteus*, entre otros (Paterson & Bonomo, 2005). Aunque el porcentaje de aislados con patrones de resistencia fue bajo, es importante destacar, que su presencia indica contaminación del agua con microorganismos que, de una u otra forma, han adquirido esta característica probablemente en un ambiente clínico bien sea de salud humana o veterinaria. Esto debe alertar, por cuanto, una de las principales preocupaciones de los organismos internacionales, entre ellos la OMS, es precisamente la capacidad que tiene el agua para la dispersión de la resistencia bacteriana (Chatterjee & Fleck, 2011).

Las implicaciones de los alimentos y el agua como vehículos de bacterias con resistencia adquirida frente a los antimicrobianos, ha sido bien documentada. Diversos estudios han demostrado la presencia de bacterias resistentes en alimentos de origen animal, vegetales y agua, demostrándose la potencialidad de estos sustratos como vehículos para la transferencia de gérmenes multiresistentes hacia la comunidad y esta tasa de diseminación es directamente proporcional a la carga microbiana

que se pueda hallar en ellos (Bywater *et al.*, 2004). Se habla de aislamientos, inclusive, con expresión de mecanismos complejos como BLEEs, carbapenemasas, AmpC, entre otros, que están creando alarma entre la comunidad científica por cuanto la tasa de dispersión es exageradamente rápida. De esta reflexión se desprende el rol que debe ejercer la comunidad científica en proponer ejecutorias que conlleven a entender el fenómeno y detallar los correctivos necesarios para disminuir su impacto.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los Autores declaramos no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Al-Shuneigat J., Cox S. & Markham J. (2005). Effects of a topical essential oil-containing formulation on biofilm-forming coagulase-negative staphylococci. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**: 52-55.
- APHA (American Public Health Association) (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th Edition. Washington DC, USA.
- Balzer M., Witt N., Flemming H. & Wingender J. (2010). Faecal indicator bacteria in river biofilms. *Water Sci Technol.* **61**: 1105-1111.
- Biendo M., Canarelli B., Thomas D., Roousseau F., Hamidad F., Adjide C., *et al.* (2008). Successive emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a University hospital. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 1037-1044.
- Burmolle M., Webb J., Rao D., Hansen L., Sorensen S. & Kjelleberg S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3916-3923.
- Bywater R., Deluyker H., Deroover E., De Jong A., Marion H., Mac Conville M., *et al.* (2004). A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob Chemother.* **54**: 744-754.
- Chatterjee P. & Fleck F. (2011). Mobilizing political will to contain antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ.* **89**: 168-169. [on-line]. Consultado en: <http://w.w.w.who.int/bulletin/volumes/89/3/11-030311.pdf>.
- Chaves L., Simoes M. & Joao M. (2007). Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:6192-6200.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-First informational supplement. Document M100-S21, **31**: 1-165.
- De Meirelles F., De Meirelles A., Gomes M., Gonçalves V., Brum P., Almeida E., *et al.* (2002). Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz. J Microbiol.* **33**: 287-293.
- De Sousa C, Colmenares M, Correia A. (2008). Contaminación bacteriológica en los sistemas de distribución de agua potable: Revisión de las estrategias de control. *Bol. Mal. Salud Amb.* **48**: 17-26.
- Famiglietti A., Quinteros M., Vázquez M., Marín M., Incola F., Radice M., *et al.* (2005). Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev. Arg. Microbiol.* **37**: 57-66.
- Flemming H. C. (2002). Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 629-640.
- Gaceta Oficial de la República de Venezuela N°: 36395. (1998). Ministerio de Sanidad y Asistencia Social: *Normas sanitarias de calidad del agua potable*. Año CXXV-Mes V.
- Goode C. & Allen D. (2011). Effect of calcium on moving-bed biofilm reactor biofilms. *Water Environ. Res.* **83**: 220-232.
- Hoffmann K., Deutsmann A., Weitzer C., Joaining M., Zechner E., Hogenauer C., *et al.* (2010).

- Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*. **125**: 960-963.
- Horcajada J., Martínez J., Alcón A., Marco F., De Lazzari E., De Matos A., *et al.* (2006). Acquisition of Multidrug-Resistant *Serratia marcescens* by Critically Patients Who Consumed Tap Water During Receipt of Oral Medication. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 774-777.
- Hunter P. (2003). Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. *J. Water Health.* **01**: 65-72
- Juhna T., Birzniece D., Larsson S., Zulenkovs D., Sharipo A., Azevedo N., *et al.* (2007). Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7456-7464.
- Koo H., Jiang Z., Brown E. & Garcia C. (2008). Coliform Contamination of Vegetables Obtained from Popular Restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Clin. Infect. Dis.* **47**:218-221.
- Lachmayr K., Kerkhof A., Di Rienzo G., Cavanaugh C. & Ford T. (2009). Quantifying nonspecific TEM β -lactamases (*bla*_{TEM}) genes in wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:203-211.
- Martínez D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos de detección fenotípica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **29**: 78-83.
- Méndez H. & de Méndez M. (1986). Estratificación social y biología humana: método de Graffar modificado. *Arch. Venez. Pueric. Pediatr.* **49**: 93-104
- Narisawa N., Haruta S., Arai H., Ishii M. & Igarashi Y.. (2008). Coexistence of antibiotic-producing and antibiotic sensitive bacteria in biofilms is mediated by resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3887-3894.
- Nogueira G., Nakamura C., Tognim M., Abreu B. & Dias B. (2003). Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. *Rev. Saúde Pública.* **37**: 232-236.
- Obiri K., Okore A. & Jones K. (2003). The microbiological quality of drinking water sold on the streets in Kumasi, Ghana. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 334-339.
- Paterson D. & Bonomo R. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol Rev.* **18**: 657-686.
- Pathak S. & Gopal K. (2008). Prevalence of bacterial contamination with antibiotic resistant and enterotoxigenic fecal coliforms in treated drinking water. *J. Toxicol. Environ. Health.* **71**: 427-433.
- Pereira L., Sakagawa N., Torres R., De Paiva J., De Lima J. & Teixeira I. (2010). Microbiological evaluation of drinking water used in feeding units. *Ciencia & Saúde Colectiva.* **15**: 63-66.
- Rodríguez J. & Pascual A. (2008). Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **26**:107-114.
- Sirajul M., Brooks A., Kabin M., Jahid I., Shafiqul M., Goswami D., *et al.* (2007). Faecal contamination of drinking water sources of Dhaka city during the 2004 flood in Bangladesh and use of disinfectants for water treatment. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 80-87.
- Smith S., Campbell S., Webster D., Curley M., Leddin D. & Forward K. (2009). A study of the prevalence of cytotoxic and non cytotoxic *Klebsiella oxytoca* fecal colonization in two patient populations. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **20**: 169-172.
- Welch P., David J., Clarke W., Trinidad A., Pender D., Bernstein S., *et al.* (2000). Microbial quality of water in rural communities of Trinidad. *Pan. Am. J. Public Health.* **8**: 172-180.
- Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., *et al.* (2008). Koneman: diagnóstico microbiológico, texto y atlas en color. 6^a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- WHO (2011). *Guidelines for drinking-water quality*. Fourth Edition. [on-line]. Consultado en: <http://www.who.int/en/>

Recibido el 30/11/2011
Aceptado el 07/03/2012

