Universidad Iberoamericana Puebla

Repositorio Institucional **http://repositorio.iberopuebla.mx**

ExpoIbero Otoño 2023

Análisis de la resistencia a los antibióticos de aislados bacterianos provenientes del cauce del río Atoyac

Gómez Ríos, Ian Alejandro

2023

https://hdl.handle.net/20.500.11777/5917

http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf

Análisis de la resistencia a los antibióticos de aislados bacterianos provenientes del cauce del río Atoyac

Gómez Ríos Ian Alejandro (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)[1], Luna Hernández Ximena (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)[1], Sulbarán Pérez Luis Alejandro (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)[1], Thomen Roldan Sofia (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)[1], Zurita López Mercedes Guadalupe (tercer semestre en Ingeniería Biomédica)[1,*], López Molina María Guadalupe (Profesor responsable)[1], Balbuena Alonso María Guadalupe (profesor asesor)[2], Gómez Martínez Jessica (profesor asesor)[2], López Cruz Lesther Emmanuel (profesor asesor)[1].

[1]*Laboratorio de Ecología y Biotecnología Aplicada, Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México*

[2]*Centro de Investigaciones en ciencias microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*

Resumen

El uso indiscriminado de antibióticos ha acelerado el proceso para que diversas bacterias adquieran resistencia a estos fármacos. Esto no es un problema menor, ya que se prevé que la resistencia bacteriana a los antibióticos puede llegar a ser la principal causa de muerte en las siguientes décadas. Este problema ha escalado a tal punto que no solo las bacterias patógenas en hospitales presentan resistencia, sino que también existe la posibilidad de que bacterias ambientales encontradas en nichos ecológicos contaminados puedan presentar estas características. Se evaluó la resistencia a diferentes antibióticos de bacterias aisladas de muestras de agua del río Atoyac en la zona urbana de Puebla. Además, se realizó la caracterización bioquímica de los aislados bacterianos. La mayor resistencia se registró en seis aislados bacterianos, los cuales crecieron en presencia de cuatro diferentes antibióticos, este estudio genera bases para el análisis de la problemática por la contaminación de antibióticos en aguas residuales.

Palabras clave: bacteria, antibiótico, genes de resistencia, medio ambiente.

***Autor Corresponsal:** mercedes.zurita@iberopuebla.mx

Introducción

Los contaminantes emergentes (CE) abarcan compuestos los cuales varían en su naturaleza química, así como en su origen; actualmente los CE presentan una serie de consecuencias relacionadas a la salud pública y problemas ecológicos de contaminación,-estos compuestos ingresan al ambiente a través de distintas fuentes, como lo son las aguas residuales de tipo doméstico, agrícolas y ganaderas, industriales y hospitalarias [1]. Los CE no son eliminados durante su paso por las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales (PTAR). Esta situación se ha convertido en un motivo de preocupación científica, debido a que genera una acumulación de estos compuestos en el medio acuático. [2] Uno de los grupos de CE con mayor interés son los fármacos, en específico, los antibióticos, que son compuestos utilizados para la eliminación de bacterias patógenas en seres humanos y animales. La deficiencia en los procesos de depuración se relaciona directamente a la contaminación producida por antibióticos en cuerpos de agua que promueve que diferentes géneros bacterianos se vuelvan resistentes a este tipo de fármacos [3].

La resistencia a los antibióticos se define como la capacidad que tienen determinadas bacterias para inhibir los efectos de los antibióticos, esto sucede mediante un proceso de selección natural dentro de una población o de varias poblaciones bacterianas, que involucra la transferencia de genes especializados que les permiten la supervivencia [4]. Como consecuencia se ha incrementado la ineficacia, cada vez más común de estos medicamentos que, a su vez, dificulta el tratamiento de algunas infecciones o enfermedades [5].

La creciente resistencia a antibióticos presenta una amenaza que a largo plazo puede convertirse en una emergencia de salud mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado esta problemática como una crisis inminente, que se prevé alcance su punto máximo para el año 2050 y que pueda causar más muertes que el cáncer, lo que la convertiría en la principal causa de muerte a nivel mundial. [6]. Ante la urgencia del problema se considera necesario empezar a exponer la gravedad de este y comenzar a hacer algo al respecto, antes de que las consecuencias se vuelvan irreparables en diferentes ámbitos de la vida, ya que esto no solo atacará al sector salud, sino que también llegará afectar en lo económico, político y social. [7]

La contaminación de los ríos es un problema preocupante, en México cerca del 70% de los ríos del país presentan algún grado de contaminación [8]. En la región del centro del país se encuentra uno de los ríos que más destaca por su alta contaminación, el río Atoyac; con una extensión de aproximadamente 200 km, y su altitud abarca desde los 2,016 hasta los 5,200 metros sobre el nivel del mar. Este río es un receptor muy grande de descargas domésticas e industriales, las cuales no son tratadas ni controladas adecuadamente [9].

Metodología

Aislamiento microbiano de las muestras de aguas del río Atoyac

Muestras de aguas del río Atoyac fueron recolectadas en la zona urbana de la ciudad de Puebla, en las inmediaciones del complejo cultural universitario de la BUAP con las siguientes coordenadas: 19°03’02.93’’ N, 98°22’49.20’’ W. Las muestras fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Mediante la técnica de diluciones seriadas de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000 se realizó el proceso de aislamiento y

obtención de bacterias. Las muestras fueron inoculadas por técnica de extensión en placas Petri con agar Luria-Bertani (LB) utilizando 100 µL de cada una de las diluciones, las placas Petri fueron incubadas a 35 °C por las siguientes 24 horas. La purificación de los aislados bacterianos se realizó a través de resiembra continua por la técnica de agotamiento en placa con estriado cruzado hasta obtener bacterias puras.

Identificación microbiológica

Se llevaron a cabo tinciones de Gram, con los reactivos cristal violeta, lugol, acetona y safranina; para identificar las morfologías y clasificar en Gram positivas y Gram negativas a los aislados. Las muestras bacterianas teñidas fueron observadas con un microscopio Leica DM500 a 100x.

Evaluación del crecimiento bacteriano con diferentes antibióticos.

Los aislados bacterianos obtenidos fueron cultivados con agitación a 180 rpm en 10 mL de medio de cultivo líquido LB por 24 horas a temperatura ambiente. Se realizó un ensayo de sellado masivo en placa Petri, para esto, se colocaron 100 µL de cada cultivo bacteriano en placas multipozos y se utilizó un replicador de 48 pozos de la marca Sigma Aldrich con el cuál se inocularon las bacterias por triplicado en placas Petri con medio agar LB adicionado con diferentes concentraciones de antibióticos (ver, tabla 1) [10]. Las placas Petri inoculadas con cada una de las bacterias se incubaron por 48 horas a 35°C.

Tabla 1 Antibióticos utilizados y el tipo de Gram blanco del mecanismo de acción de cada uno de ellos.

Nombre	Gram	Concentración
Amoxicilina con ácido clavulánico	Ambos	15 µg
Ciprofloxacino	Ambos	5µg
Ceftriaxona	Ambos	30µg
Cloranfenicol	Ambos	30 µg
Ampicilina	Ambos	10 µg
Clindamicina	Positivas	2 µg
Azitromicina	Negativas	15 µg
Gentamicina	Negativas	10 µg
Dicloxacilina	Positivas	10 µg

Pruebas bioquímicas

Las bacterias obtenidas fueron caracterizadas por su metabolismo a través de nueve pruebas bioquímicas: agar McConkey, agar citrato de Simmons, agar sal y manitol, agar EMB (Eosina y azul de metileno), agar sangre suplementada con sangre desfibrinada de cordero, agar DNasa, agar MIO (movilidad, indol y ornitina descarboxilasa) y actividad oxidasa y catalasa. Las primeras seis pruebas fueron realizadas en placas Petri, inoculadas mediante la toma de una asada microbiológica y estría con cola de ratón de cada aislado bacteriano. El agar MIO fue vertido en tubos de ensayo estériles e inoculados con las bacterias por punción en el medio de cultivo. Finalmente, las pruebas de oxidasa y catalasa se realizaron con el kit de Sigma Aldrich y por adición de H_2O_2 a un frotis bacteriano en portaobjeto, respectivamente.

Resultados y Discusión

Identificación microbiológica de las bacterias provenientes de las aguas residuales del río Atoyac

Se obtuvieron un número total de 27 aislados bacterianos (diferentes morfologías de crecimiento en placa), para este trabajo se les denominó con la abreviatura UIA (Universidad Iberoamericana Puebla) y con número ascendente del 1-27 por orden de purificación. Con la ayuda de las tinciones de Gram se identificaron 21 aislados bacterianos Gram positivo y 6 Gram negativo, que corresponde al 78% y 22% del cepario axénico. También se identificaron las características morfológicas que se observar en la Fig.1.

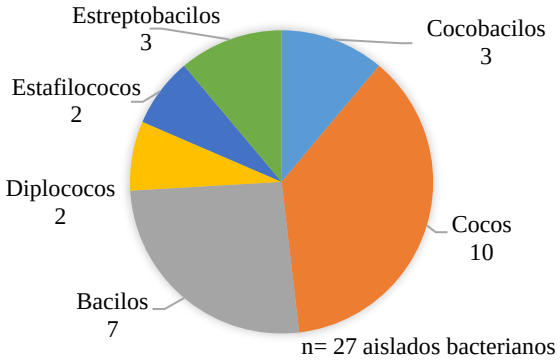

Fig. 1. Morfologías identificadas a través de la tinción de Gram y observación en el microscopio con 100x.

Resistencia a los antibióticos de los aislados bacterianos de las aguas del río Atoyac

De los 27 aislados evaluados en presencia de 9 antibióticos, el mayor número de crecimiento de bacterias fue en presencia de amoxicilina y ampicilina, dos compuestos β-lactámicos que son ampliamente utilizados en el área clínica y ganadera [11] (Fig.2). Se pudo observar que 22 aislados bacterianos tienen la capacidad de crecer en uno o más antibióticos, presentando un efecto de multi-drogorresistencia. En la Fig.3 se puede observar que los aislados UIA-3, UIA-9, UIA-10, UIA-13, UIA-24 y UIA-25 son resistentes a cuatro antibióticos diferentes: Amoxicilina con ácido clavulánico, Ampicilina, Clindamicina y Dicloxacilina. Los aislados UIA-1, UIA-4, UIA-5, UIA-6 y UIA-7 no crecieron en ninguno de los antibióticos utilizados.

Identificación de las características metabólicas de aislados bacterianos

En la prueba de oxidasa se comprobó la presencia de esta enzima (catalizadora de reacciones por medio de O_2) en 12 de los 17 aislados evaluados. Por otra parte, en la prueba de catalasa, 14 aislados fueron positivos, esta enzima es parte del sistema antioxidante.

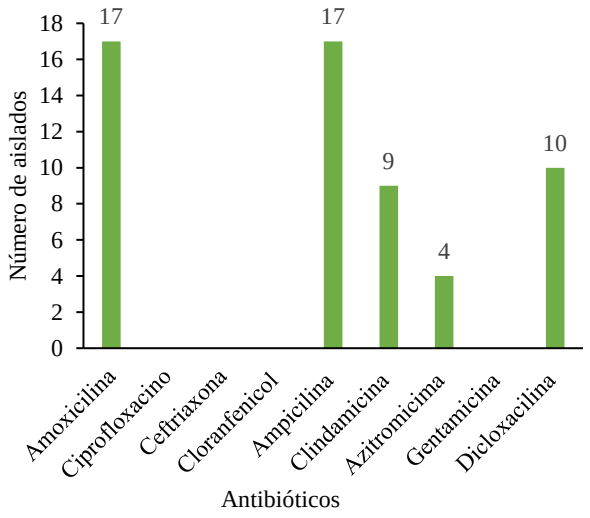

Fig. 2. Número de aislados bacterianos que presentaron crecimiento en los 9 antibióticos.

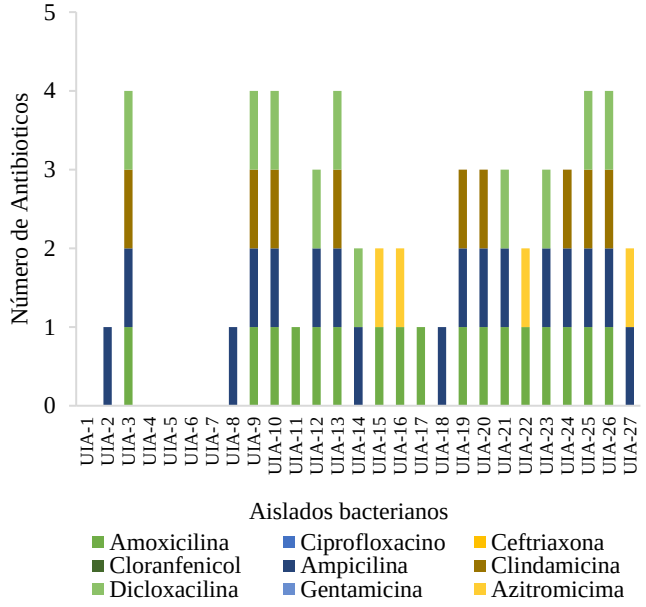

Fig. 3. Multi-drogorresistencia de los aislados bacterianos (UIA) con 9 diferentes antibióticos.

Identificación de las características metabólicas de aislados bacterianos

Las 9 pruebas bioquímicas realizadas nos ayudaron a conocer algunas características metabólicas de los aislados seleccionados (Tabla 2).

En la prueba de oxidasa se comprobó la presencia de esta enzima (catalizadora de reacciones por medio de O_2) en 12 de los 17 aislados evaluados. Por otra parte, en la prueba de catalasa, 14 aislados fueron positivos, es decir, liberaron oxígeno, apareciendo burbujas indicando que poseían esta enzima, la cuál es parte del sistema antioxidante

Con la realización de la prueba de agar Citrato de Simmons se demuestra la capacidad de utilizar citrato como fuente única de carbono, esta prueba fue positiva en 14 de los aislados bacterianos, al igual, se observó que 7 de los aislados que crecieron se tornaron de una coloración azul debido a la alcalinización en el medio, estos fueron: UIA-10, UIA-12, UIA-13, UIA-14, UIA-15, UIA-19, y UIA-23. Por medio de esta prueba se pueden identificar géneros bacterianos, como lo son: *Enterobacter, Pseudomonas, Citrobacter, Aeromonas hydrophila.*

Con el agar McConkey se pudo observar la diferenciación entre bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa; solo 4 aislados fueron positivos: UIA-15, UIA-19, UIA-20 Y UIA-22, esto se observó debido a que se tornaron de un color rosado. Esta prueba nos puede indicar la presencia de *Enterobacteriacea,* o *E. coli.*

Por medio del agar Sal y manitol se observó la fermentación de manitol en 12 aislados bacterianos, debido a la acidificación y cambio de color del indicador fenol rojo. En esta prueba solo 5 cepas no presentaron cambio de coloración, estas fueron la UIA-19, UIA-22, UIA-24, UIA-25 y UIA-27; todas las demás presentaron un cambio de coloración indicando producción de ácidos por parte de las bacterias. En esta prueba crecen y se desarrollan de la mejor manera las bacterias del género *estafilococos.*

Con la prueba MIO tornó turbio. Con respecto a la enzima, solo 6 aislados fueron poseedoras de ellas, esto se observó gracias a la glucosa del medio, su fermentación se observa con un cambio de una coloración amarilla. Por último, se observaron 4 aislados con detección de indol.

Mediante el agar sangre se evaluó la capacidad hemolítica y esto reveló 9 cepas positivas: UIA-3, UIA-9, UIA-13, UIA-14, UIA-15, UIA-16, UIA-23, UIA-25 Y UIA-26. Lo que significa que estos aislados pueden llegar a causar un deterioro en los glóbulos rojos. Este agar sugiere la presencia de géneros bacterianos: *Streptococcus salivaris, Bacillus cereus, E.coli* (al igual que como en el agar Mcconkey) y *Pseudomonas aeruginosa.*

La capacidad de reducción del azul de metileno se demostró gracias a la prueba EMB, que se indica por la decoloración del medio. En esta prueba 10 de los aislados bacterianos presentaron una coloración verde metálico; mientras que las otras 7 se presentó solo crecimiento, los 10 aislados que presentaron esta coloración de un verde metálicos fueron: UIA-3, UIA-9, UIA-10, UIA-15, UIA-19, UIA-20, UIA-22, UIA-24, UIA-25 y UIA-27. El crecimiento en este medio indica posibles microorganismos de la familia *enterobacteriaceae* y de la presencia de bacilos Gram-negativos.

El ensayo del agar DNasa mostró que 12 de los aislados contenían la enzima desoxirribonucleasa (hidroliza el ADN). Se muestra que el porcentaje predominante en cuanto a morfologías encontradas pertenece a los cocos, de igual manera las tinciones de Gram mostraron que la mayoría de los aislados contaban con una tinción positiva (coloración violeta), esto significa que en su pared celular cuentan con una gruesa capa de peptidoglicano.

Tabla 1. Características metabólicas de los aislados bacterianos seleccionados

Aislado bacteriano	UIA 3	UIA -9	UIA -10	UIA -12	UIA -13	UIA -14	UIA -15	UIA -16	UIA -19	UIA -20	UIA -21	UIA -22	UIA -23	UIA -24	UIA -25	UIA -26	UIA -27
Catalasa	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sal y manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Hemólisis	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Movimiento	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilasa	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
EMB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos, la hipótesis planteada en un inicio fue comprobada, existen bacterias en ambientes contaminados con resistencia a diferentes antibióticos, de las cepas evaluadas en las pruebas, 17 de los 27 aislados bacterianos son resistentes a más de dos antibióticos. Las bacterias UIA-3, UIA-9, UIA-10, UIA-13, UIA-25 y UIA-26 presentaron resistencia a cuatro antibióticos diferentes, además cinco de estos aislados bacterianos tienen la capacidad de generar hemolisis, excepto la bacteria UIA-10. Debido a su morfología y características metabólicas, se sugiere la presencia de géneros bacterianos como *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Este trabajo demuestra la prevalencia de resistencia a antibióticos en muestras de aguas del Río Atoyac, lo cual es un riesgo latente para la salud humana y animales que están en interacción con este nicho ecológico. A la vez, se sientan las bases para futuras investigaciones, se realizarán más pruebas con distintos antibióticos, así como una línea enfocada a estudiar los mecanismos de transferencia y adaptación de las bacterias de sitios contaminados y su identificación a nivel molecular.

Referencias

[1] L.-J.-D. Producción and De, “Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments Contaminantes emergentes em águas, efeitos e possíveis tratamentos,” vol. 7, no. 2, 2012, Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf

[2] C. García-Gómez, P. Gortáres-Moroyoqui y P. Drogui, “Contaminantes emergentes: Efectos y tratamientos de remoción”, *Química Viva*, vol. 10, n.º 2, pp. 96–105, agosto de 2011.

[3] K. Barrantes, L. Chacón, and María Arias-Andrés, “El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible,” *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, nov. 2021, DOI: https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590.

[4] “Resistencia bacteriana”, Rev. Cuba. Medicina Mil., vol. 8, n.º 1, pp. 44–48, 2003.

[5] Y. López, Y. Gamboa, Y. Rodríguez y. Arteaga, “Resistencia microbiana a los antibióticos: Un problema de salud creciente”, *Hallazgos21*, vol. 7, n.º 1, pp. 103–114, enero de 2022.

[6] WHO, “Resistencia a los antimicrobianos,” Who.int, nov. 17, 2021. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance.

[7] J. Del Arco, “Antibióticos: Situación actual”, Farm. Prof., vol. 28, n.º 5, pp. 29–33, 2014

[8] P. Terras, “Ríos tóxicos”, *Green Peace*, p. 5, 2012.

[9] Río Atoyac, “Saneamiento del Río Atoyac,” gob.mx, 2023. https://www.gob.mx/semarnat/rioatoyac/articulos/saneamiento-del-rio-atoyac

[10] “M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 32nd Edition.” Available: https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf

[11] C. Suárez y F. Gudiol, “Antibióticos betalactámicos”, Enfermedades Infecc. Microbiol. Clin., vol. 27, n. º 2, pp. 116–129, febrero de 2009. Accedido el 15 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible: https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001