

## Bacterias heterótrofas aisladas del lago de los Reyes Aztecas (Tlahuac) y su resistencia a diferentes antibióticos

Antonia Correa-Basurto, María T. Núñez-Cardona\* y Silvia D. Peña-Betancourt

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento El Hombre y su Ambiente  
Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, C. P. 04960. Distrito Federal, México.

Recibido 6 Noviembre 2006, revisado 24 Marzo 2007, aceptado 19 Abril 2007

---

*Heterotrophic bacteria of the Reyes Aztecas Lake (Mexico City) and their resistance to distinctive antibiotics.*

### Abstract

At the present time a great number of antibiotics have been used for health care in human beings as well in animals, and also they are used in food production and other industries. Usually the main destination of not assimilated antibiotics is the environment. This is one of the reasons why it is common to find bacteria that are resistant to antibiotics because they have different mechanisms to create resistance, one of them is the beta-lactamases production and another is the presence of plasmids into their cells. With the aim to know the impact of the antibiotics in Los Reyes Aztecas Lake (Tlahuac, Distrito Federal), bacterial cultures were used as bio indicators. Using sterilized flasks water samples were obtained in different points of this lake (19°19'2.3" North, 99° 00' 55.5" West). Serial dilutions were done and nutrient agar plates were inoculated with 0.1 ml of each dilution. The cultures were incubated to 30 °C during 24-48 h before isolating bacteria colonies. We got 27 pure cultures and they were exposed to 12 different antibiotics, all of them specific for Gram negative bacteria. 26 of these cultures were rods and only one strain coco bacilli, all of them were Gram negative. The sensitivity-resistance to the different antibiotics of the strains isolated showed that more than 50% of the strains were resistant to cephalothin (70 %), ampicillin (63%) and carbenicillin (52%); these antibiotics are used commonly by the health sector. A low number of bacteria were resistant to nitrofurantoin (33%), chloramphenicol (26%), gentamicin and ceftriaxone (22%, each), cefotaxime (19%), pefloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole (11%, each), amikacin (7%), and netilmicin (4%). With these results we can say that most of the strains had not been exposed to antibiotics like we tested, and that these strains have not acquired resistance to them. We also expected to find a great number of colonies, but we could only recover them just to the 10<sup>-2</sup> dilution, and so we believe that, the antibiotics and other compounds and components could be regulating the activity of the aerobic heterotrophic bacteria in Los Reyes Aztecas Lake.

*Keywords:* heterotrophic bacteria, antibiotic resistance, Los Reyes Aztecas Lake, cephalothin, ampicillin.

### Resumen

Actualmente se utiliza un gran número de antibióticos no sólo para proteger a los humanos y animales contra infecciones, sino también para la producción de alimentos y otras industrias. Se sabe que las bacterias cuentan con mecanismos de resistencia diferentes, dentro de los cuales está la producción de beta-lactamasas y la presencia de plásmidos. Con el objetivo de conocer el impacto de residuos de antibióticos presentes en el lago de los Reyes Aztecas (Tlahuac, Distrito Federal), se utilizó cultivos bacterianos como bioindicadores. Para ello, se colectaron muestras de agua en tres puntos diferentes del lago (19°19'2.3" Norte y 99° 00' 55.5" Oeste), con las cuales se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en agar nutritivo (no selectivo) Después de 24-48 horas de incubación a 30 °C, se aisló y obtuvo cultivos puros bacterianos para exponerlos a 12 antibióticos específicos para bacterias Gram negativas. Se obtuvieron 27 cultivos unespecíficos, 26 de ellos presentaron formas de bacilos y sólo una cepa de cocobacilos. Todos ellos mostraron una respuesta negativa a la tinción de Gram. Los resultados de las pruebas de sensibilidad-resistencia a los antibióticos ensayados, revelaron que más del 50 % de las cepas fueron resistentes a la cefalotina (70%), ampicilina (63%) y carbenicilina (52%). Porcentajes bajos de resistencia se presentó para los antibióticos nitrofurantoina (33 %), cloranfenicol (26%), gentamicina y ceftriaxona (22%), cefotaxima (19%), pefloxacina y trimetroprim-sulfametoxazol (11%), amikacina (7%) y netilmicina (4%).

A través de estos resultados se puede decir que la mayoría de las bacterias que hay en este sistema no han sido expuestas a los antibióticos estudiados por lo que no han adquirido resistencia.

---

\* Autor para correspondencia

E-mail: mtunuez@correo.xoc.uam.mx; fax: 54837469

Cabe señalar que se esperaba registrar un número mayor de colonias en las diluciones mayores a  $10^{-2}$ , lo cual hace pensar que hay compuestos y componentes, diferentes a los antibióticos, que podrían estar regulando la actividad de las bacterias en el lago de Los Reyes Aztecas.

*Palabras clave:* bacterias heterótrofas, resistencia a antibióticos, lago Los Reyes Aztecas, cefalotina, ampicilina

---

## Introducción

Los medicamentos son de gran importancia en la prevención y combate de las enfermedades tanto de los humanos como de los animales, sin embargo, poco se sabe sobre su efecto potencial en el medio ambiente debido a que después de que son administrados, absorbidos, metabolizados y excretados estos compuestos pueden llegar a los sistemas acuáticos por aportes directos de aguas residuales de origen doméstico, hospitalario, industrial, agropecuario o bien por los arrastres pluviales (Boxall, 2004). En estos sistemas, los medicamentos del tipo de los antibióticos, contribuyen al estrés bacteriano y al deterioro ambiental, además de provocar un fuerte impacto negativo en la salud de los humanos, animales y plantas, afectando de manera negativa a su desarrollo y fertilidad.

Al impactar indistintamente a la biota bacteriana natural y la de origen antropogénico, también alteran los ciclos biogeoquímicos en los cuales las bacterias son esenciales para que estos se lleven a cabo (Webb, 2001; Kolpin et al., 2002)

Aunque se ha estudiado el efecto de los antibióticos en la salud humana y animal, se conoce poco acerca del impacto potencial por su uso inadecuado y desmesurado por lo que actualmente es un tema de interés para la comunidad científica (Boxall, 2004)

Se ha observado, que en los últimos años aumentó el uso de antibióticos en el sector agrícola e industrial así como el número de bacterias multiresistentes a ellos, lo cual ha conllevado a la búsqueda de antibióticos nuevos (Cabello, 2004). Estos microorganismos cuentan con mecanismos diferentes para resistir a la exposición a los antibióticos tales como la síntesis de enzimas que los inactivan (Ej. betalactamasas); mutaciones de su material genético y la presencia de plásmidos, entre otros (Fuchs et al., 1994).

Este problema ambiental que puede generarse por el uso cada vez más intenso de antibióticos y que favorece el desarrollo de bacterias capaces de resistir a un número cada vez mayor de antibióticos

ha despertado el interés de estudiar a las bacterias que habitan el lago de los Reyes Aztecas, Tláhuac, y, en especial, conocer su respuesta al ser expuestas a antibióticos de uso común. Este lago se encuentra en la región chinampera de Xochimilco y Tlahuac, localizada en las inmediaciones de la Ciudad de México, presenta problemas de deterioro ambiental debidos principalmente, al crecimiento urbano de la Ciudad de México, a la sobreexplotación de sus mantos acuíferos, a la contaminación por metales pesados y al incremento de la concentración de sales (Ramos-Bello et al., 2001).

## Material y Métodos

La zona de estudio es el Lago de los Reyes Aztecas, el cual está ubicado en la Delegación Tláhuac (Distrito Federal), es una región con una gran actividad agropecuaria; forma parte de un complejo turístico junto con Xochimilco, además de ser una de las fuentes de abastecimiento de agua potable para los habitantes del Distrito Federal.

Se localiza entre las coordenadas:  $19^{\circ}19'2.3''$  Norte y  $99^{\circ}00'55.5''$  Oeste, la altitud aproximada es de 2240 msnm, el clima es templado con variaciones de humedad; la precipitación es de 970 mm anuales concentrada de junio a octubre y la temperatura media anual es de  $16^{\circ}\text{C}$  con extremos de  $9$  a  $33^{\circ}\text{C}$ . La hidrografía está condicionada por la permeabilidad de los suelos y las variaciones climáticas que se registran zonalmente (Ramos-Bello et al., 2001)

*Colecta de las muestras.* En tres puntos de este lago, se colectó muestras de agua del nivel superficial, mediante el uso de botellas de vidrio estériles de 250 ml de capacidad. Para su procesamiento, fueron conservadas a  $4^{\circ}\text{C}$  y transportadas al Laboratorio de Ecología Microbiana de la UAM-Xochimilco.

*Obtención de cepas puras.* Con las muestras de agua colectadas, se hizo diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$  y con 0.1 ml de cada una de éstas, se inoculó cajas Petri conteniendo agar nutritivo (no selectivo). Los cultivos fueron incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 horas. Pasado este tiempo, se

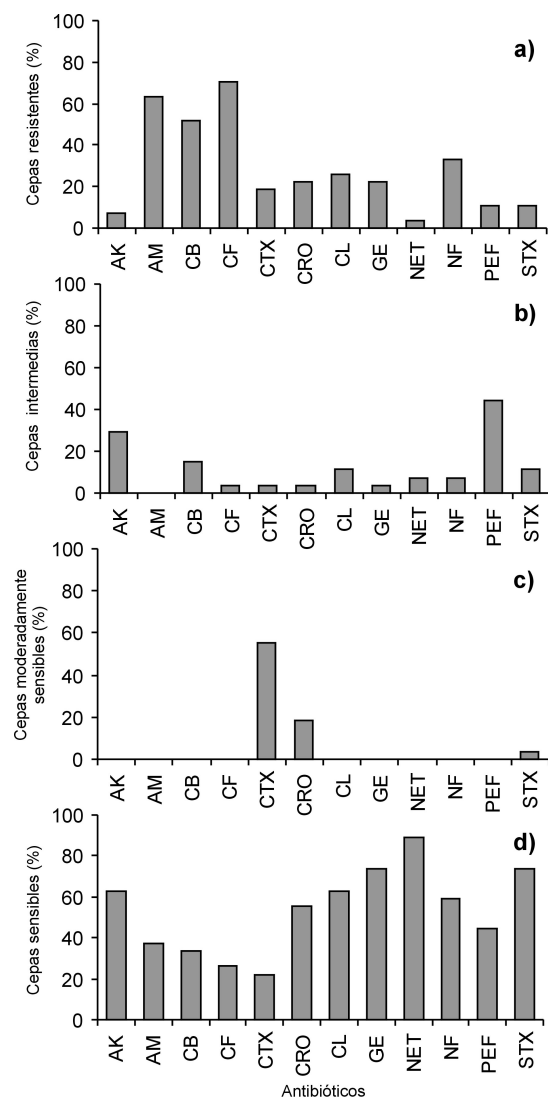


Fig. 1. Resistencia y sensibilidad de las cepas (%) a 12 antibióticos específicos para bacterias Gram negativas: a) cepas resistentes; b) cepas con respuesta intermedia; c) cepas moderadamente sensibles y c) cepas sensibles. AK-Amikacina, AM-Ampicilina, CB-carbenicilina, CF-Cefalotina, CTX-cefotaxima, CRO-ceftriaxona, CL-cloranfenicol, GE-gentamicina, NET-netilmicina, NF-nitrofurantoina, PEF-pefloxacina, STX--trimetroprim-sulfa.

cuantificó, aisló al azar y resembró colonias diferentes. Mediante el uso de la técnica de siembra y resiembra, se obtuvo cultivos bacterianos puros y

su uniespecificidad se verificó mediante observaciones directas de su morfología colonial y al microscopio óptico para conocer su forma

celular; para esto último se aplicó la tinción de Gram.

*Respuesta de las cepas bacterianas a diferentes antibióticos.* Con la finalidad de contar con biomasa bacteriana abundante y suficiente, se hizo crecer a las cepas bacterianas en caldo nutritivo considerando las recomendaciones estándar para el ensayo de pruebas de sensibilidad-resistencia a antibióticos (Crespo, 2002).

A partir de los cultivos líquidos en crecimiento, se inoculó cajas de Petri con agar de Mueller-Hinton, específico para pruebas de sensibilidad a antibióticos (Murray y Zeiting, 1983) y con la ayuda de pinzas estériles, se colocó los sensidiscos que contenían 12 antibióticos específicos para bacterias Gram negativas.

Los antibióticos incluidos en los sensidiscos son los siguientes (abreviatura y concentración del antibiótico): ampicilina (AM, 10 mcg), cefalotina (CF, 30 mcg), carbenicilina (CB, 100 mcg), cloranfenicol (CL, 30 mcg), cefotaxima (CTX, 30 mcg), netilmicina (NET, 30 mcg), ceftriaxona (CRO, 30 mcg), amikacina (AK, 30 mcg), trimetoprim-sulfametoxazol (STX, 25 mcg), pefloxacina (PEF, 5 mcg), nitrofurantoína (NF, 300 mcg) y gentamicina (GE, 10 mcg).

Los cultivos con los sensidiscos se incubaron a 28°C durante 24 horas y después de este tiempo se hizo las lecturas tomando como base las recomendaciones del manual de uso de los multidiscos BIO-RAD. De acuerdo con estas, la respuesta de las bacterias puede ser: resistente, intermedia, moderadamente sensible y sensible, dependiendo de la formación o no de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano y de su diámetro. El tamaño del halo depende del tipo y concentración del antibiótico, expresado en µg. Cuando el halo de inhibición es menor o igual a 10-19 mm se considera que son cepas resistentes; para una respuesta intermedia el halo debe medir entre 15-27 mm; para bacterias moderadamente sensibles entre 14-29 mm; finalmente, para bacterias sensibles de 15-30 mm o más. Considerando, además, la respuesta de cepas de referencia a la exposición a diferentes antibióticos (incluidos en el manual de uso de los sensidiscos utilizados de la marca BIO-RAD).

## Resultados

En los tres puntos de muestreo, se obtuvo crecimiento bacteriano únicamente en las diluciones no mayores a  $10^{-2}$ . Aún cuando se incubó a los cultivos por más de 48 horas, el número de bacterias heterótrofas aerobias fue mucho menor que el de un ambiente oligotrófico como el marino. En este tipo de ambientes es posible obtener crecimiento bacteriano en diluciones mayores a  $10^{-4}$ .

Se obtuvo un total de 27 cepas bacterianas puras, 26 de ellas presentaron forma de bacilos y una de cocobacilos; el total de cepas presentaron respuesta negativa a la tinción de Gram, esto último es característico de los ambientes acuáticos, en los que las bacterias Gram negativas son las que predominan.

En cuanto a la respuesta de las 27 cepas puras a los diferentes antibióticos, los resultados obtenidos se presentan en las figuras 1a-1d. Como se observa en la figura 1a, el 70% de las cepas fueron resistentes a la cefalotina, el 63% a la ampicilina y el 52% a la carbenicilina, porcentajes menores de resistencia se observó para la nitrofurantoína (33%), el cloranfenicol (26%), la ceftriaxona y gentamicina (ambas con el 22%), la cefotaxima (19%), finalmente, el trimetoprim-sulfametoxazol y la pefloxacina (11% cada una), la amikacina (7%) y netilmicina (4%).

La respuesta intermedia de sensibilidad a los antibióticos ensayados, se observó en el 44% de las cepas para la pefloxacina, seguida de la amikacina con el 30%, el cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol con el 11%, finalmente, la netilmicina y nitrofurantoína con el 7% (Figura 1b). Como se observa en la Figura 1c, las cepas fueron moderadamente sensibles a tres de los antibióticos estudiados, que incluyó a la cefotaxima (55%), la ceftriaxona (18%) y trimetoprim-sulfametoxazol (4%).

Más del 50% de las cepas fueron sensibles a ocho de los antibióticos, de esta forma se tiene que el 89% lo fue para la netilmicina, el 74% para gentamicina y el trimetoprim-sulfametoxazol; el 63% para el cloranfenicol y la amikacina, el 59% para la nitrofurantoína, el 26% para la ceftriaxona, el 33% para la carbenicilina, el 37% para la ampicilina y el 22% para la cefotaxima (Figura 1d).

## Discusión

De acuerdo con Ramos-Bello et al. (2001), el complejo de la zona chinampera Tláhuac-Xochimilco se encuentra seriamente amenazado por el aumento de la salinidad en el agua y el suelo, las bacterias halotolerantes, como es el caso de las que habitan en el lago de los Reyes Aztecas, presentan proteínas que reducen la permeabilidad de sus membranas y aumenta la resistencia a diferentes factores ambientales que incluye a los antibióticos (Lovoba et al., 2002), sin embargo, en este sistema se observó un número mucho menor de bacterias heterótrofas que el que podría encontrarse en un sistema oligotrófico como es el ambiente marino.

Como se indicó en los resultados antes expuestos, las bacterias aisladas del lago de los Reyes Aztecas, mostraron ser más resistentes a cefalotina y ampicilina, ambos pertenecen a los antibióticos betalactámicos, que son los agentes antimicrobianos más nuevos y sofisticados (Arias et al., 2000) además de ser los que se prescriben con más frecuencia alrededor del mundo, lo cual explica el incremento en la resistencia a este tipo de compuestos (Pitout et al., 1997), cabe señalar que la carbenicilina, es también un beta-lactámico de espectro amplio y que el 52% de las cepas aisladas fueron resistentes a este antibiótico.

En especial, la resistencia a la ampicilina ha sido observada en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y *Escherichia coli*, esta última es considerada y utilizada para evaluar la actividad e impacto debidos a las actividades antropogénicas. Además, se ha observado la presencia de genes de resistencia a la ampicilina en organismos pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Ash et al., 2002), los cuales cuentan con especies patógenas para los humanos.

Cabe señalar que el agua del lago de los Reyes Aztecas, es utilizada para la agricultura y que la presencia de bacterias resistentes a la ampicilina podría representar un riesgo para la salud de los habitantes de esta zona, incluyendo a los animales que habitan en el lago tales como el ajolote, *Ambystoma mexicanum*, que es una de las especies

endémicas de este sistema acuático.

Aún cuando el lago de los Reyes Aztecas es alimentado con agua tratada proveniente del Cerro de la Estrella (Ramos-Bello et al., 2001) y es el destino final de aguas residuales domésticas y agropecuarias (que podrían ser fuentes importantes de antibióticos), se observó que más del 50% de las cepas aisladas mostró sensibilidad a siete de los antibióticos ensayados, incluyendo al cloranfenicol el cual ha sido relacionado con problemas de cáncer en los humanos, esto muestra que probablemente las bacterias que habitan el lago no han estado expuestas por periodos largos de tiempo a la mayoría de los antibióticos aquí ensayados, sin embargo, aunque en porcentajes bajos, se detectó bacterias resistentes a la cefotaxima y ceftriaxona, dos antibióticos betalactámicos pertenecientes a la tercera generación de las cefalosporinas.

De acuerdo con Pitout et al. (1997) y Arias et al. (2000), la resistencia a este tipo de agentes antibacterianos va en aumento gracias a su capacidad para producir  $\beta$ -lactamasas, así como el desarrollo de enzimas nuevas o la alteración en su nivel de expresión, asociado con la presión del medio ambiente.

## Conclusiones

Las bacterias aisladas del lago de los Reyes Aztecas presentaron porcentajes importantes de resistencia a la cefalotina, ampicilina y carbenicilina, tres antibióticos del tipo de los  $\beta$ -lactámicos que son ampliamente utilizados en el sector salud, además de ser de los más sofisticados y novedosos.

## Bibliografía

- Arias, M.L., Monge R., Artavia J. y Gonzalez G. 2000. Antimicrobial susceptibility pattern of Gram negative bacteria isolated from enteral feeding. *Revista Biomedica* 11: 169-174.
- Ash, R.J., Mauck, B. y Morgan, M. 2002. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 713-715.
- Boxall, A.B.A. 2004. The environmental side effects of medication. *European Molecular Biology Organization*, 5: 110-116.
- Cabello F.C. 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Revista Medica*

- Chilena, 132: 1001-1006.
- Crespo, M.P. 2002. La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colombia Médica*, 33: 179-193.
- Fuchs, Y., Chihu, L., Conde, C., González, V.M, Noguez, A.H., Calderón, E., Avonce, N., y Ovando, C. 1994. Mecanismos Moleculares de Resistencia Bacteriana. *Salud Pública de México*, 36: 428-438.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. y Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36: 1202-1211.
- Lovoba, T.I., Barkhatov, Y.V. y Popova L.Y. 2002. Antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in Shira lake: natural and anthropogenic impacts. *Aquatic Microbial Ecology*, 30:11-18.
- Murray, R.P y Zeiting, R.J. 1983. Evaluation of Mueller-Hinton agar for disk diffusion susceptibility tests, 18: 1269-1271.
- Ramos-Bello, R., Cajuste, J.L., Flores-Roman, D. y García Calderón, E.N. 2001 Metales pesados, sales y sodio en suelos de Chinampa en México. *Agrociencia* 35: 385-394.
- Pitout, J.D., Sanders, C.C., y Sanders, W.E., 1997. Antibiotic resistance with focus  $\beta$ -lactam resistance in gram negative bacilli. *The American Journal of Medicine*, 103: 51-59.
- Webb, S.F. 2001. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. III. Indirect human exposure. In: K. Kummerer (ed.), *Pharmaceutical Environment*. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 221-230.

---

Este trabajo fue seleccionado de los presentados en el II Congreso Regional de Ciencias Ambientales celebrado en Ciudad Obregón, México, en Noviembre de 2006.