

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POST GRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

TESIS DE MAESTRÍA

**DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
PESADOS EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS AISLADAS DE LA
QUEBRADA SAN CRISTÓBAL-TRAMO UNACHI**

Por

Yorlenis Esther Saldaña Sánchez

4-734-1299

Trabajo de graduación
presentado como requisito
para optar por el título de
Magister en Microbiología
Ambiental.

2018

Dedicatoria

Quiero ofrecer gratitud a Dios, por darme la salud, la sabiduría, la fuerza para cumplir una meta más en mi vida.

A mis Padres Manuel Saldaña y Maritza Esther de Saldaña, quienes me apoyaron desde el inicio de mi carrera profesional, muchas gracias por sus consejos, por velar por mi educación, por sus oraciones y por acompañarme en este sueño que hoy se convierte en realidad.

A mis hermanos Juan Manuel Saldaña y Yoisy Atenas Saldaña, por motivarme a cumplir mis sueños, gracias por confiar en mí.

A Cesar A. Gómez, por formar parte de mis metas y por creer en mi capacidad.

Hoja de agradecimiento

A mi tutor principal M. SC. Luis González, gracias por darme la oportunidad de trabajar en esta investigación, por sus recomendaciones, enseñanzas, experiencia y su tiempo, que hoy me permite alcanzar una meta más.

Quiero agradecer también al Dr. Orlando Cáceres por brindarme su ayuda en este estudio, por sus recomendaciones y su tiempo para cumplir satisfactoriamente este trabajo de investigación.

Agradezco al M. SC. Rogelio Santanach, por sus conocimientos, orientación y motivación para lograr culminar con éxito mi trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma de Chiriquí por permitirme realizar la parte experimental y utilizar los equipos de laboratorio para llevar a cabo esta investigación; y a todos los profesores del programa de maestría en microbiología ambiental, por aportar de sus conocimientos a nuestros estudios.

Quiero agradecer a mis compañeros de estudio que de alguna manera me brindaron su apoyo y motivación para culminar esta maestría.

ÍNDICE GENERAL.....	Vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	iX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
ASPECTOS GENERALES DEL PROBLEMA.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6
ALCANCE DEL TRABAJO.....	7
LIMITACIONES.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	8
4. MARCO TEÓRICO.....	9
4.1. BACTERIAS.....	9
4.1. ANTIBIÓTICOS.....	10
4.2. METALES PESADOS.....	11
4.3. RESISTENCIA BACTERIANA.....	11
4.4. TIPOS DE RESISTENCIA.....	13
4.4. MECANISMO DE RESISTENCIA.....	16
4.5. MECANISMO DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.....	16
4.6. PREVENCIÓN DE LA RESISTENCIA.....	17

4.7. GRUPOS DE ANTIBIOTICOS.....	17
4.7.1. CEFALOSPORINA.....	17
4.7.2. QUINOLONAS.....	18
4.7.3. AMPICILINA.....	19
4.7.4. CARBAPENEMES.....	20
4.7.5. AMINOGLUCÓSIDOS.....	20
4.8. CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS.....	21
4.8.1. FAMILIA ENTEROBACTERACEAE.....	21
4.8.2. FAMILIA PSEUDOMONACEAE.....	21
4.9. SISTEMA VITEK®2.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	23
5.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	23
5.1.1 LOCALIZACIÓN.....	23
5.1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
5.1.3 TOMA DE MUESTRAS.....	24
5.1.4 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	25
5.1.5 PRUEBA DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA BACTERIANA MEDIANTE EL SISTEMA VITEK®2.....	26
5.1.6 RESISTENCIA BACTERIANA A METALES PESADOS.....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
7. CONSIDERACIONES FINALES.....	49

8. CONCLUSIONES.....	49
9. RECOMENDACIONES.....	51
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
11. ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, Tramo UNACHI.....	26
Cuadro 2. Aislados microbianos de la quebrada San Cristóbal por puntos de muestreo.....	31
Cuadro 3. Actividad de los antibióticos frente a microorganismos gram negativos.....	64
Cuadro 4. Resistencia bacteriana a metales pesados en cepas Gram negativas.....	65
Cuadro 5. Resultados de resistencia bacteriana al Cromo en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal.....	66
Cuadro 6. Resultados de resistencia bacteriana al Arsénico en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal.....	68
Cuadro 7. Resultados de resistencia bacteriana al Plomo en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal.....	70
Cuadro 8. Resultados de resistencia bacteriana al Mercurio en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal.....	72
Cuadro 9. Resultados de la resistencia bacteriana al Cadmio en la quebrada San Cristóbal.....	74

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.....	23
Figura 2. Porcentaje de bacterias aisladas en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.....	28
Figura 3. Comportamiento de los microorganismos aislados en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI frente a antibióticos.....	34
Figura 4. Porcentaje de bacterias resistentes al Cromo en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.....	38
Figura 5. Porcentaje de bacterias resistentes al Arsénico en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.....	41
Figura 6. Porcentaje de bacterias resistentes al Plomo en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.....	43
Figura 7. Porcentaje de bacterias resistentes al Mercurio en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.....	44
Figura 8. Porcentaje de bacterias resistentes al Cadmio en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.....	46
Figura 9. Salida de aguas residuales del Hospital Regional Rafael Hernández..	57

Figura 10. Puente UNACHI.....	57
Figura 11. Salida de aguas residuales del Hospital Materno José Domingo de Obaldía.....	58
Figura 12. Agua arriba (límite tramo UNACHI).....	58
Figura 13. Muestras de agua (en frascos estériles) de la quebrada San Cristóbal.....	59
Figura 14. Siembra de las muestras de agua, en caldo tioglicolato.....	59
Figura 15. Siembra por estrías en Agar Sangre y Agar MacConkey.....	60
Figura 16. Sistema automatizado Vitek®2.....	60
Figura 17. Tarjetas reactivas del Sistema Vitek®2.....	61
Figura 18. Aislamiento bacteriana en placas de agar Müller-Hinton.....	61
Figura 19. Perforación de pozos en placas de agar Müller-Hinton.....	62
Figura 20. Muestras de los pozos perforados	62
Figura 21. Preparación de las diferentes concentraciones de metales pesados.....	63
Figura 22. Resistencia de bacterias a metales pesados.....	63

1. RESUMEN

Se determinó la resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias gramnegativas aisladas de la quebrada San Cristóbal tramo UNACHI. Para el aislamiento de microorganismos se utilizó Caldo Tioglicolato, Agar Sangre y Agar Macconkey, y para la prueba de resistencia se utilizó el sistema automatizado Vitek®2. Los antibióticos utilizados fueron cefotaxima, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e imipenem. En la prueba de resistencia y susceptibilidad se empleó el sistema Vietk®2 mediante las tarjetas GN AST N249 para bacilos gramnegativos. Se obtuvo un total de 41 aislados microbianos de once especies diferentes de bacterias gramnegativas de los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Providencia* y *Proteus*. Los mayores porcentajes de cepas resistentes fueron con respecto a cefotaxima y ampicilina. De los aislados microbianos las especie de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mostraron mayor resistencia a cefotaxima y ampicilina. Se utilizaron concentraciones mínimas de metales pesados como Acetato de plomo (II), Óxido de arsénico (III), Cloruro de mercurio (II), Óxido de cromo (IV) y Cloruro de cadmio y se evaluó en agar Müeller Hinton los efectos de éstos sobre su crecimiento. Los microorganismos identificados mostraron mayores resistencias al arsénico y al plomo. Las bacterias del género *Enterobacter* mostraron mayor resistencia al arsénico y las especies de *Klebsiella pneumoniae* mostraron mayor resistencia al plomo. La presencia de bacterias resistentes a antibióticos representa un riesgo para los seres humanos y el ambiente. La resistencia de las bacterias a metales pesados, confirma su relación con la presencia de microorganismos resistentes a antibióticos cuando los genes responsables de esta resistencia se encuentran en el mismo plásmido.

Palabras Claves: antibiograma, sensibilidad bacteriana, resistencia a metales pesados, contaminación.

2. ABSTRACT

Resistance to antibiotics and heavy metals was determined in gram-negative bacteria isolated from the San Cristobal ravine UNACHI stretch. For the isolation of microorganisms was used Tioglicolato Broth, Blood Agar and Macconkey Agar was used and the resistance test the automated system Vitek®2 was used. The antibiotics used were cefotaxime, ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin and imipenem. In the test of resistance and susceptibility the system Vietk®2 was used by means of the cards GN AST N249 for gram-negative bacilli. A total of 41 microbial isolates from eleven different species of gram-negative bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Providencia* and *Proteus* were. The highest percentages of resistant strains were with respect to cefotaxime and ampicillin. Of the microbial isolates the species of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, showed greater resistance to cefotaxime and ampicillin. Minimum concentrations of heavy metals were used such as lead acetate (II), arsenic oxide (III), mercury chloride (II), chromium (IV) oxide and cadmium chloride and the effects of these were evaluated in Müller Hinton agar about its growth. The microorganisms identified showed greater resistance to arsenic and lead. The bacteria of the genus *Enterobacter* showed greater resistance to arsenic and the species of *Klebsiella pneumoniae* showed greater resistance to lead. The presence of bacteria resistant to antibiotics poses a risk to humans and the environment. The resistance of bacteria to heavy metals confirms their relationship with the presence of antibiotic resistant microorganisms when the genes responsible for this resistance are found in the same plasmid.

Key words: antibiogram, bacterial sensitivity, resistance to heavy metals, contamination.

CAPÍTULO 1. MARCO INTRODUCTORIO

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente es motivo de una preocupación mundial. El ambiente está sometido constantemente a un deterioro progresivo debido al incremento de desechos domésticos e industriales, que generan elevados niveles de contaminación química y biológica. En particular, la contaminación por compuestos químicos incluye a los metales y a los antibióticos, estos últimos están considerados dentro de los llamados contaminantes emergentes. Estas sustancias tóxicas liberadas, fundamentalmente por actividades antropogénicas, han contribuido a la degradación de los ecosistemas, lo que consecuentemente repercute en la salud humana (Veranes, 2013). Los centros de atención en salud, especialmente los hospitales, constituyen importantes puntos de origen de descargas de antibióticos hacia el ambiente, produciendo un fuerte impacto en la composición física, química y biológica de los cuerpos receptores (Tzoc *et al.* 2004). Dentro de esta perspectiva, los hospitales, y más específicamente sus descargas líquidas, ejercen una presión selectiva sobre la biota presente en los cuerpos receptores que los reciben, contribuyendo a la selección de microorganismos con patrones de resistencia múltiple a antibióticos, ya sea por la presencia de los antibióticos en las descargas o por la transmisión de factores de resistencia hacia las bacterias propias de las aguas superficiales. En

consecuencia, estas propiedades de resistencia bacteriana se están convirtiendo en un problema sanitario, ecológico y económico (Gómez *et al.* 2007).

La contaminación ambiental con metales pesados constituye un creciente problema mundial. Estos elementos químicos representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables. Solo los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales son capaces de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de esos elementos. Los microorganismos resistentes a metales pesados presentan potencialidades para el diseño de tecnologías aplicables en el campo de la biorremediación de ambientes contaminados (Marrero *et al.* 2010). Las aguas residuales además de contener antibióticos, y, por tanto, ejercer presión selectiva, contienen también habitualmente bacterias patógenas, que entran en contacto con los microorganismos medioambientales presentes en estos lugares. En estas circunstancias, se favorece el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos, de modo que se ha considerado que estos ecosistemas son "reactores de la resistencia" en los que puede tener lugar el primer paso en la transmisión de determinantes de resistencia de las bacterias ambientales a las bacterias patógenas (Baquero *et al.* 2008, citado en Martínez 2010).

Dada la importancia y actualidad del tema para la salud de la población, la presente investigación buscará como objetivo determinar en aislados

bacterianos de la quebrada San Cristóbal Tramo UNACHI, la resistencia a antibióticos y metales pesados.

1.1. ASPECTOS GENERALES DEL PROBLEMA

La calidad de las aguas puede ser alterada como consecuencia de las actividades antropogénicas o naturales que producen efectos adversos, que cambian su valor para el hombre y la biota.

Durante los últimos años la quebrada San Cristóbal, en David, Chiriquí ha sido afectada, ya que expertos han advertido el grado de contaminación por encima de los valores permitidos, donde el mayor foco de contaminación se ubica debajo del puente elevado en la entrada de la Universidad Autónoma de Chiriquí.

El abuso indiscriminado de los antimicrobianos está causando un incremento en la resistencia de bacterias. De forma natural, los metales son introducidos a los sistemas acuáticos como resultado de la lixiviación de suelos y rocas, y erupciones volcánicas (Laws, 1993). También pueden provenir de las actividades antropogénicas como son, agrícolas, domésticas, industriales y mineras (Mountouris *et al.* 2002).

Las altas concentraciones de metales pesados en las aguas de corrientes fluviales asociados a sulfuros tales como el arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn) pueden atribuirse a la minería lo cual son causa del fuerte impacto en el medio ambiente (Salomons, 1995).

En cambio, otros metales no-sulfurosos como el cromo (Cr), níquel (Ni) y mercurio (Hg) posiblemente indican una contaminación antropogénica de metales pesados que están estrechamente asociados con las descargas industriales (Nelson *et al.* 1993).

1.3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la resistencia a antibióticos y metales pesados de bacterias gramnegativas aisladas en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Aislar microorganismos presentes en el agua de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.
- b. Identificar las bacterias aisladas de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.
- c. Describir los perfiles de susceptibilidad de las cepas resistentes a antibióticos y a metales pesados de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.

1.5. ALCANCE DEL TRABAJO

Este proyecto de investigación describe como el uso indiscriminado de los antibióticos y la contaminación ambiental por metales pesados ha conducido la selección de cepas resistentes a estos agentes químicos. La investigación abarca cuatro puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal tramo UNACHI, debido a que se han realizados estudios previos que indican que el Hospital Regional Rafael Hernández descargan estos agentes químicos en los efluentes de la quebrada. El proyecto explica y describe como la exposición de microorganismos nativos frente a ecosistemas contaminados con metales y desechos domésticos, ha permitido la aparición y selección de bacterias resistentes a varios antibióticos y a metales pesados.

1.6. LIMITACIONES

- Falta de insumos de laboratorio para técnicas específicas.
- Falta de estudios previos realizados en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI para hacer comparaciones.

1.7. JUSTIFICACIÓN

La susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos ha sido ampliamente demostrada. En el ambiente existen muchas cepas de diferentes especies de bacterias que son resistentes a los antibióticos y que se desarrollan en focos naturales como agua, suelo y aire. Puesto que nuestra quebrada objeto de este estudio recibe aporte de instituciones en cuanto a drenaje de agua grises y negras, la determinación de las poblaciones bacterianas presentes en el sitio de estudio será de utilidad en la planificación de medidas de mitigación de la contaminación bacteriana mediante depuración, así como la prevención de infecciones a través de previsión de otras medidas.

Conociendo la realidad de la provincia y la de otros países, espero que este trabajo de investigación genere una información de utilidad que se convierta en un importante elemento para disminuir la resistencia bacteriana a antibióticos y a metales pesados, consiguiendo una mayor organización, racionalización y garantizando una mejor educación en el uso de los antibióticos, aportando así al campo científico, tratando de mejorar la realidad de nuestro medio, a la sociedad, la salud y la calidad de vida, vigilando de mejor manera el tratamiento.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. BACTERIAS

Son microorganismos unicelulares procariotas, que se caracterizan porque no presentan núcleo y se reproducen por fisión binaria. Son ubicuas, ya que se encuentran en todos los hábitats de la Tierra como suelo, agua, aire y como simbiontes, parásitos o patógenos. Según su criterio evolutivo, se dividen en Eubacterias que son aquellas que viven en el suelo, agua y organismos vivos; por ejemplo las bacterias de interés médico, cianobacterias, las bacterias verdes fotosintetizadoras; mientras que las arqueobacterias comprenden las bacterias sin peptidoglicano como las anaeróbicas que viven en condiciones ácidas calientes, ácidas salinas y las que reducen el dióxido de carbono a metano. Según su forma se clasifican en cocos (forma redondeada), bacilos (forma alargada y cilíndrica), espirilos (de aspecto helicoidal) y vibrios (forma curva). Se diferencian por su pared celular en gramnegativos, ya que tienen una sola capa de peptidoglicano y grampositivos que presentan varias capas. En cuanto a su nutrición la mayoría de las bacterias son heterótrofas, en menor cantidad, autótrofos, saprófitas o simbiontes (Vargas *et al.* 2014).

2.2. LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción (Brugueras & Morejón 1998). Según su origen se dividen en biológicos que son aquellos sintetizados por organismos vivos, semisintéticos aquellos que son obtenidos por modificación química de antibióticos naturales y sintéticos aquellos que son generados mediante síntesis química. Los antibióticos actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, ya sea por bloqueo directo del lugar catalítico de alguna enzima, o mediante la formación de complejos con determinados sustratos. Otros inhiben la síntesis proteica y la mayoría lo hacen uniéndose a distintas bases nitrogenadas del ARN ribosómico (ARNr) que forman parte del centro de decodificación, del centro de formación de enlaces peptídicos (peptidiltransferasa) o de la región próxima de la entrada al túnel de salida del péptido recién sintetizado. Algunos actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Martínez & Sánchez, 2007).

Los antibióticos generalmente ayudan a las defensas de un individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección. Un antibiótico es bacteriostático si impide el crecimiento de los gérmenes, y bactericida si los destruye, pudiendo generar también ambos efectos, según los casos (García, 2014).

2.3. METALES PESADOS

Son sustancias propias de la naturaleza, de peso molecular muy alto, con una densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 en su forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Estos presentan diferentes características físicas, químicas y biológicas; se encuentran formando complejos como iones libres o participando en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicas para los organismos (Marrero *et al.* 2010).

2.4. RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana se define como una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostático de un antibiótico (Mariscal, 2000). La resistencia de los microorganismos a múltiples sustancias es un problema de salud pública observado a nivel mundial, debido a la aparición y uso masivo de los antibióticos (Ramos & Alonso 2011).

La resistencia a los antibióticos se ha detectado en bacterias presentes en líquidos y barros cloacales urbanos, líquidos residuales hospitalarios, aguas subterráneas y ríos contaminados con descargas de aguas negras (Núñez *et al.* 2012). La presencia de antibióticos en el ambiente acelera la aparición de patógenos resistentes, difíciles de controlar.

Otra forma de contaminación ambiental lo constituye la emisión de metales pesados al ambiente a partir de fuentes antropogénicas que involucran la descarga de desechos tóxicos a partir de la actividad industrial. Los contaminantes más abundantes en aguas residuales industriales son los metales pesados.

El comportamiento de los microorganismos frente a los antibióticos, ha tenido un efecto colateral en la expresión de la resistencia a metales pesados a consecuencia de la presencia de genes en un mismo plásmido, que pueden conferir co-resistencia a estos compuestos (Martínez *et al.* 2010). De manera simultánea, la presencia de metales pesados en un ecosistema puede dar lugar al desarrollo de microorganismos resistentes a estas sustancias químicas tóxicas, así como los antibióticos. La correlación de la resistencia a metales pesados y los antibióticos entre aislados clínicos y ambientales genera un gran interés científico y ambiental, si se tiene en cuenta que dentro de los contaminantes más abundantes en residuos industriales se encuentran los metales pesados (Veranes, 2013).

El amplio uso de los antibióticos constituye el principal factor de selección de la resistencia bacteriana a estos compuestos; sin embargo, puede actuar también como un importante factor secundario en la selección de bacterias resistentes a metales pesados, debido a que se ha reportado que un mismo plásmido puede

contener genes capaces de conferir resistencia a antibióticos y genes que confieren resistencia a metales pesados (Panigua *et al.* 2003).

2.5. TIPOS DE RESISTENCIA

- **Mecanismo de resistencia intrínseca:** son aquellos mecanismos de defensa que se encuentran en la célula de forma natural, se encuentran en las bacterias y es independiente de la selectividad de los antibióticos, como por ejemplo la disminución de la permeabilidad de la membrana, alteración del sitio diana y la inactivación de enzimas.
- **Mecanismo de resistencia adquirida:** la capacidad del microorganismo para adaptarse a diferentes ambientes, se debe a la adquisición de genes capaces de proveer defensa ante los antibióticos. Cuando el microorganismo adquiere resistencia a un antibiótico, entonces éste puede transferir genes de resistencia a otros microorganismos por medio de elementos genéticos móviles como plásmidos, bacteriófagos o transposones (Valenzuela *et al.* 2016).

2.6. MECANISMO DE RESISTENCIA

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. Utilizan una bomba expulsora para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además agentes antibacterianos. Otro mecanismo que utilizan las bacterias es la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas) y la producción de enzimas que inactivan el efecto de los antibióticos. De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por la acetil transferasa, y el caso más típico, el de las betalactamasas, para el grupo de los betalactámicos.

Este mecanismo se ve representado en la especie *P. aeruginosa* que se caracteriza porque tiene en su membrana externa, la porina OprD. Este patrón de resistencia a imipenem está relacionado con la pérdida de esta porina, la cual es utilizada solo por los carbapenemes para ingresar a la célula bacteriana (Lösch *et al.* 2004). La membrana externa de *P. aeruginosa* juega un rol principal en la resistencia a los antibióticos, ya que limita la penetración de pequeñas moléculas hidrofílicas y excluye las moléculas más grandes. Pequeños antibióticos hidrofílicos tales como los β -lactámicos y las quinolonas sólo pueden atravesar la membrana externa pasando a través de canales acuosos constituidos en el interior de unas proteínas designadas porinas (Lujan, 2014).

Ciertos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el microorganismo modifica la proteína diana, cambia su función o produce enzimas distintas (Riverón *et al.* 2003).

Según Coila (2017), la célula bacteriana utiliza diversos mecanismos para desarrollar resistencia a los metales pesados. Entre estos podemos mencionar: exclusión de metales por barrera de permeabilidad, eflujo de metales por transporte activo (los microorganismos exportan los metales tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular), secuestro intracelular (acumulación de los metales en el citoplasma).

2.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La resistencia es la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible. Esto involucra la aparición de cambios en el material genético del microorganismo, que se transmite a sus descendientes (Chirinos, 1999).

Un antibiótico necesita alcanzar su diana de acción, en una concentración suficiente y durante el tiempo adecuado, para poder inhibir el crecimiento o causar la muerte bacteriana. Sin embargo las bacterias pueden utilizar diferentes mecanismos como por ejemplo:

- Evitar que el antibiótico entre en la bacteria, modificando su pared celular o su membrana haciéndola impermeable a la entrada del antibiótico.
- Producir enzimas que modifican o inactivan al antibiótico.
- Modificar la diana de acción del antibiótico.
- Expulsar el antibiótico al exterior de la bacteria, a través de bombas de flujo.
- Proteger la diana o el antibiótico evitando la interacción entre ambos.

2.8. PREVENCIÓN DE LA RESISTENCIA

La utilización de antibióticos antes de que aparezca la infección, para intentar prevenirla ha agravado el problema de las resistencias. Su uso inadecuado para el tratamiento de las gripes u otras infecciones virales comunes, contra las que estos fármacos no tienen ningún efecto, elimina las bacterias sensibles a los antibióticos y permite el desarrollo de las bacterias resistentes. La utilización de antibióticos debe realizarse con supervisión médica (Crespo, 2004).

2.9. GRUPO DE ANTIBIÓTICOS

2.9.1. CEFALOSPORINAS

Son productos de origen natural derivados de productos de la fermentación de *Cephalosporium acremonium*, que muestra acción bactericida frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos. Las cefalosporinas constituyen un numeroso grupo de antibióticos que pertenecen a la familia de los β -lactámicos. Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas de amplio espectro que presentan una toxicidad baja para el ser humano debido a que su modo de acción involucra la unión con enzimas que participan en la síntesis de la pared celular (González *et al.* 2007).

Las cefalosporinas se clasifican clásicamente en generaciones, en base al espectro de actividad para microorganismos grampositivos y gramnegativos. En términos generales, a medida que evolucionan en generaciones ganan actividad frente a microorganismos gramnegativos, reduciéndola frente a grampositivos; y

también mejoran su comportamiento en relación al principal factor de resistencia (betalactamasas), siendo las cefalosporinas de tercera y cuarta generación más estables que las de primera y segunda, frente a estas enzimas.

Los beta-lactámicos ejercen su actividad antimicrobiana inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, produciendo la lisis bacteriana (Mella *et al.* 2001).

2.5.2. QUINOLONAS

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos de amplio espectro, cuyo blanco es la síntesis del ADN, conduciendo la lisis bacteriana mediante la fragmentación cromosómica. Penetran la pared celular a través de las porinas, inhibiendo la replicación bacteriana al interactuar con ADN girasa y topoisomerasas IV, las cuales son necesarias para para el superenrollamiento del ADN (Álvarez *et al.* 2015). Son activas frente a las bacterias gramnegativas y han sido ampliamente utilizadas por su actividad bactericida desde la introducción de la ciprofloxacina en 1987. El número de bacterias resistentes a las quinolonas han ido aumentando, lo que se relaciona con el extenso uso. Al igual que las cefalosporinas, las quinolonas se clasifican en generaciones. Otros mecanismos de resistencia que desarrollan algunas bacterias gramnegativas están relacionados con la alteración de la permeabilidad bacteriana, disminuyendo la penetración intracelular del antibiótico y la actividad de transportadores activos endógenos que provocan la expulsión de los antimicrobianos desde la membrana celular al medio exterior y por lo tanto,

impide la entrada de estos antibióticos a la bacteria. En bacterias gramnegativas el patrón de resistencia a quinolonas es causada fundamentalmente por mutaciones cromosómicas, alteraciones en las dianas y pérdida de porinas (Campos *et al.* 2008).

2.5.3. AMPICILINA

Es un antibiótico que pertenece a los beta-lactámicos. Posee un amplio espectro frente a grampositivas y gramnegativas. Su mecanismo de acción se da al interferir en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano uniéndose a proteínas específicas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular produciendo la lisis de la bacteria (Mosquito *et al.* 2014). Pertenece al grupo de las penicilinas y se obtiene a partir de la acilación del ácido 6-aminopenicilánico. Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo, donde cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas. El *meningococo* y la *Listeria* son sensibles a la ampicilina. Algunas cepas de *neumococo*, *Haemophilus influenzae* no productor de betalactamasas y *Streptococcus viridans* presentan resistencia variable a la ampicilina (Gómez *et al.* 2015).

2.5.4. CARBAPENEMES

Antibióticos que pertenecen al grupo de los beta-lactámicos que presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo (Suarez *et al.* 2206). Son altamente potentes contra gramnegativas y grampositivas. Estas cualidades hacen que los carbapenémicos sean imprescindibles en el tratamiento de infecciones nosocomiales graves y en el tratamiento de bacterias gramnegativas productoras de β -lactamasas de amplio espectro (Moreno, 2013). Imipenem es el primer carbapenem desarrollado para uso clínico. Es un derivado semisintético producido por *Streptomyces spp.* Otros compuestos más modernos son meropenem y ertapenem. Los antibióticos beta-lactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.

2.5.5. AMINOGLUCÓSIDOS

La historia de los aminoglucósidos comienza en 1944 con la estreptomina obtenida de cepas del *Streptomyces griseus*. La aparición posterior de kanamicina en 1957 y, más tarde, de gentamicina y tobramicina constituyeron verdaderos avances en el tratamiento de las infecciones causadas por bacilos gramnegativos, de manera que dichos antimicrobianos se convirtieron en el tratamiento habitual de estas infecciones. Los aminoglucósidos son activos frente a la mayoría de especies de Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae.

La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, transporte a través de la membrana interna y, finalmente, la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, que inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (Palomino & Pachón, 2002).

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS

3.1 FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE: constituye un grupo heterogéneo de bacterias gramnegativas ampliamente distribuidas en plantas, tierra, agua e intestino de hombres y animales, y se hallan entre los microorganismos más importantes desde el punto de vista médico. Algunos géneros son enteropatógenos humanos importantes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), mientras otros son colonizantes habituales del tracto gastrointestinal (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*). Debido a su ubicuidad dentro y fuera del cuerpo, a menudo causan infecciones oportunistas en pacientes debilitados (Ocaña *et al.* 2007).

3.2. FAMILIA PSEUDOMONADACEAE: constituida por cocos y bacilos gramnegativos aerobios, incluye al género *Pseudomonas*, que poseen diversos factores estructurales y toxinas que incrementan su potencial virulento y suelen ser resistentes a la mayoría de los antibióticos. Se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza, cuyas especies con mayor importancia en

patología médica son *P. aeruginosa*, *P. mallei* y *P. Pseudomallei*. La especie que más se ha aislado es la *P. aeruginosa* y se ha asociado con la contaminación de fuentes comunes como agua, antisépticos y equipos médicos (Lebeque *et al.* 2006).

4. SISTEMA VITEK®2

Es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. Incluye una extensa base de datos de identificación, que le permite detectar un amplio rango de microorganismos en un tiempo más reducido. El sistema VITEK®2 es óptimo cuando se utiliza para microorganismos gramnegativos y grampositivos aislados más frecuentemente en el laboratorio de microbiología clínica ya que permite obtener los resultados más rápidos (Vargas *et al.* 2005).

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1. Localización

La provincia de Chiriquí está localizada en el extremo suroccidental de la República de Panamá y tiene una superficie de 8,653.23 Km cuadrados. La investigación se desarrolló en el distrito de David, en la quebrada San Cristóbal-tramo UNACHI, provincia de Chiriquí (Figura 1).



Fuente: <https://www.google.com.pa/maps/place/Quebrada+San+Cristobal/>

Figura 1. Localización de los puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.

3.2. Diseño experimental

La determinación de la resistencia a antibióticos y a metales pesados de bacterias aisladas de la quebrada San Cristóbal tramo UNACHI, se realizó bajo un diseño experimental aleatorio.

3.3. Toma de Muestra

La toma de muestra se realizó según Martínez *et al.* (2010). La colecta de las muestras se llevó a cabo en cuatro puntos aleatorios de la quebrada San Cristóbal (cuadro 1). Estos se seleccionaron por la cercanía de posibles fuentes contaminantes. Las muestras se colocaron en frascos plásticos estériles de 100 mL debidamente rotulados; se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Chiriquí y se procesaron de inmediato. En cada punto se tomaron dos muestras de aguas, considerada como representativa para la realización del presente estudio.

Cuadro 1. Descripción de los puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI, David. Fuente: Saldaña, 2016.

Puntos de Muestreos	Descripción
1	Salida de agua residuales del Hospital Regional Rafael Hernández
2	Puente UNACHI
3	Salida de agua residuales del Hospital Materno José Domingo de Obaldía
4	Agua arriba (límite tramo Universidad autónoma de Chiriquí (UNACHI))

3.4. Aislamiento e identificación de microorganismos

A partir de las muestras de agua colectadas en la quebrada San Cristóbal, se realizó un aislamiento microbiano. Se transfirió por duplicado un mililitro de cada muestra de agua y se sembraron en caldo tioglicolato para potenciar el crecimiento de las bacterias del agua, luego se incubaron a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se sembraron por estrías en agar sangre y agar Macconkey, y se incubaron a 37 °C. Después de 24 horas se observó el crecimiento de colonias en los medios de cultivos.

4.5. Prueba de sensibilidad y resistencia bacteriana mediante el sistema VITEK®2.

Del cultivo puro, se transfirió con un asa estéril una cantidad suficiente de inóculo a un tubo de ensayo que contenía 3 mL de solución salina estéril. Luego se ajustó la turbiedad a 0,50-0,63 unidades en la escala McFarland con un densitómetro.

Posteriormente se colocó el tubo de ensayo que contenía la suspensión bacteriana dentro del cassette (gradilla). Se utilizó las tarjetas GN para bacilos gramnegativos (AST N250 para prueba de susceptibilidad) y GP para cocos y bacilos grampositivos (AST P577 para prueba de susceptibilidad). Cada uno de los pocillos de las tarjetas reactivas contenía determinadas concentraciones de los antibióticos. La tarjeta de identificación se colocó en la ranura cercana, insertando el tubo de transferencia dentro del tubo con la suspensión correspondiente y se colocó el cassette con las muestras en el sistema Vitek®2. El sistema realizó automáticamente los análisis de identificación y sensibilidad, supervisando el crecimiento y la actividad de los microorganismos en el interior de los pocillos de las tarjetas de prueba.

4.6. Resistencia bacteriana a metales pesados

Según la metodología de Dupontt *et al.* (2000), la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los metales pesados para cada aislamiento bacteriano se determinó empleando placas de agar Müller Hinton, en las cuales se perforaron pozos con la ayuda de carrizos donde se agregaron las diferentes concentraciones de los metales pesados. Se emplearon los metales Acetato de Plomo (II), Óxido de Arsénico (III), Cloruro de Mercurio (II), Óxido de Cromo (IV) y Cloruro de Cadmio y las concentraciones oscilaron entre 10 Y 1 000 µg/ml (Figura 18). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas. Posteriormente se midieron los diámetros de las zonas de inhibición. La CMI de los metales se determinó como la cantidad de metal requerido para producir una zona de inhibición menor o igual a 10 mm.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se obtuvo un total de 41 aislados microbianos de once especies diferentes distribuidos en los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Proteus* y *Providencia* (Gráfico 1).

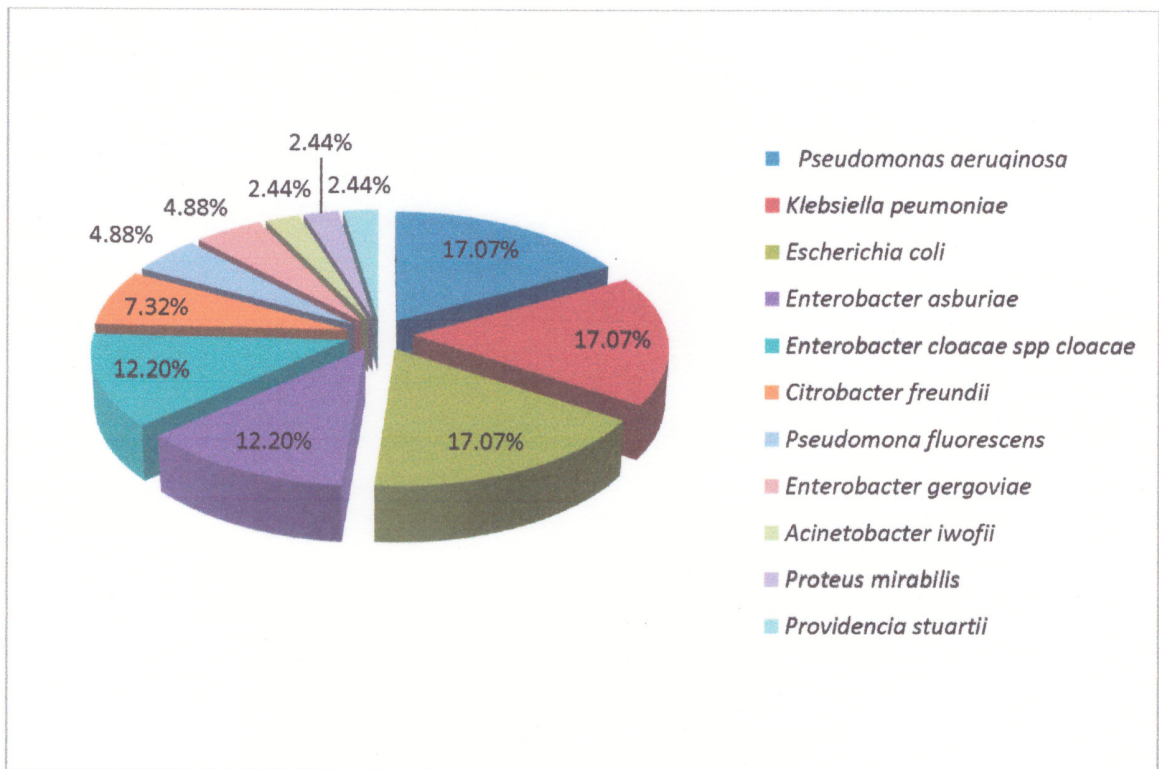


Figura 2. Porcentaje de bacterias aisladas en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI. Fuente: Saldafia, 2016.

A partir de las muestras colectadas, la mayoría de los microorganismos aislados pertenecen a la familia de las enterobacterias de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, y *Providencia*. Las enterobacterias identificadas en este estudio, coinciden con las especies bacterianas reportadas por Rivera *et al.* (2005), quienes aislaron en el Río Alseseca (Puebla-México) un total de 100 enterobacterias de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Cedacea*, *Citrobacter* y *Shigella*. El 17.07 % pertenecen a la especie *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

La presencia de estos microorganismos en el agua puede ser el resultado de una contaminación por escorrentía, contaminación fecal, descargas hospitalarias o por la actividad humana. De las especies aisladas, *Escherichia coli* se considera un indicador de contaminación fecal, capaz de causar brotes de infecciones en el ser humano, si llega estar en contacto con el agua contaminada. Por su parte Vargas (2016), demostró la presencia de *Escherichia coli* en el agua de la quebrada la porquera (Bogotá-Colombia), resultado de la contaminación fecal. Otros autores indicaron que este microorganismo aparte de causar infecciones en el hombre puede causar enfermedades en los animales que utilicen este recurso (Chin *et al.* 2012).

A partir de los datos obtenidos en este estudio el 12.20% pertenecen a la especie *Enterobacter asburiae* y *Enterobacter cloacae*, el 7.32% a *Citrobacter freundii*, el 4.88% a *Pseudomonas fluorescens* y *Enterobacter gergoviae*, mientras que solo el 2.44% pertenece a la especie *Acinetobacter lwofii*, *Proteus mirabilis* y *Providencia stuartii* (Figura 2).

Por sitio de muestreo, se puede observar que las especies de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter asburiae*, se encontraron en los cuatro puntos de muestreos de la quebrada (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislados microbianos de la quebrada San Cristóbal por puntos de muestreos. Fuente: Saldaña, 2016.

PUNTO DE MUESTREO	ESPECIE BACTERIANA
Punto 1 – HRRH	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>E. coli</i> ▪ <i>P. aeruginosa</i> ▪ <i>C. freundii</i> ▪ <i>E. cloacae ssp cloacae</i> ▪ <i>K. pneumoniae</i> ▪ <i>E. asburiae</i> ▪ <i>A. iwofii</i>
Punto 2 – Puente UNACHI	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>E. cloacae ssp cloacae</i> ▪ <i>K. pneumoniae</i> ▪ <i>P. aeruginosa</i> ▪ <i>E. coli</i> ▪ <i>E. asburiae</i> ▪ <i>P. fluorescens</i> ▪ <i>C. freundii</i> ▪ <i>E. gergoviae</i>
Punto 3 – HMJDO	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>E. coli</i> ▪ <i>E. cloacae</i> ▪ <i>K. pneumoniae</i> ▪ <i>E. asburiae</i> ▪ <i>P. aeruginosa</i>
Punto 4 – Aguas Arriba	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>K. pneumoniae</i> ▪ <i>C. freundii</i> ▪ <i>E. gergoviae</i> ▪ <i>E. coli</i> ▪ <i>E. cloacae spp cloacae</i> ▪ <i>E. asburiae</i> ▪ <i>P. aeruginosa</i>

Entre los aislados predominaron las bacterias gramnegativas. Estudios previos han demostrado que las aguas residuales hospitalarias tienen mayores niveles de bacterias entéricas (gramnegativas) resistentes a los antibióticos, por lo tanto

la concentración de antibiótico también es mayor, creando un entorno con fuerte presión selectiva (Tzoc *et al.* 2004, Martínez, 2010, Basurto *et al.* 2007). Por otra parte, las malas condiciones de saneamiento y la falta de tratamiento de residuos hospitalarios pueden establecer rutas de difusión de bacterias multirresistentes.

El aislamiento bacteriano mostró que no existe una elevada presencia de microorganismos en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI. Esta baja incidencia se ve relacionada con las épocas del año, ya que en invierno disminuyen las cargas microbianas y en la temporada de verano incrementa la presencia de microorganismos en el ambiente (Guzmán *et al.* 2007). La cantidad de microorganismos encontrados en este estudio nos indica que la vía usual de contaminación por agentes microbiológicos patógenos en el agua es provocada por los afluentes residuales de la actividad antropogénica. En la quebrada San Cristóbal pueden existir otros microorganismos no patógenos, pero que pueden ocasionar pequeñas infecciones que discurren con mayor gravedad cuando se trata de ancianos, niños o en pacientes inmunocomprometidos. Estos resultados son las consecuencias de la pérdida de la calidad ambiental, ya que la quebrada recibe descargas de aguas residuales del Hospital Regional Rafael Hernández y el Hospital José D. de Obaldía.

Resistencia bacteriana a antibióticos

El porcentaje de microorganismos resistentes a más de cuatro antibióticos, varió según el género microbiano. La respuesta de los microorganismos gramnegativos frente a los antibióticos ensayados se observa en el (cuadro 2). El 72.7 % de las cepas fueron resistentes a cefotaxima, contrario a los resultados de Rivera *et al.* (2005) quienes reportaron que el mayor porcentaje de los aislados microbianos del río Alseseca (Puebla-México) fueron resistentes a cabernicilina. El 54.5% de las bacterias aisladas mostraron resistencia a la ampicilina; mientras que el 18.2 % a ciprofloxacina y el 27.3 % a gentamicina. La resistencia a los carbapenémicos representados por el Imipenem fue prácticamente nula (Figura 3).

El comportamiento de las bacterias gramnegativas mostró cierta variación en los porcentajes de resistencia a cefotaxima, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e imipenem, pero los mayores porcentajes de bacterias fueron resistentes a cefotaxima y ampicilina en los cuatros puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal (Figura 3).

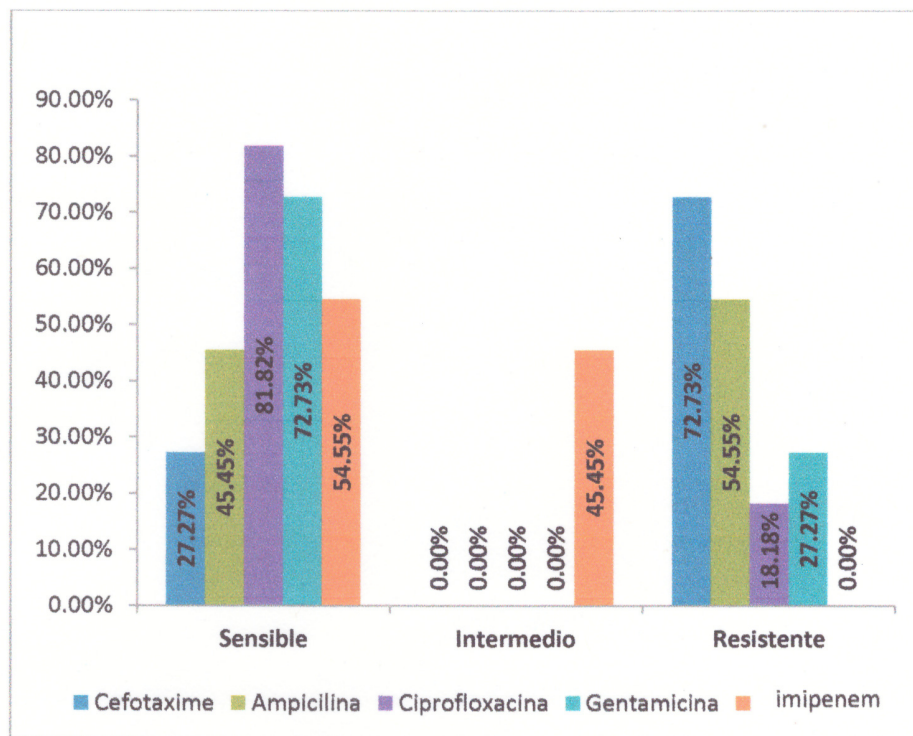


Figura 3. Comportamiento de los microorganismos aislados en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI frente a antibióticos. Fuente: Saldaña, 2016.

Estos resultados coinciden con los datos de Nuñez *et al.* (2012), quienes en su estudio demostraron que la mayor resistencia de las bacterias fue con respecto a ampicilina. Por su parte Shet *et al.* (2004), han señalado que el mecanismo más frecuente de resistencia a la ampicilina, es la producción de enzimas inhibidoras denominadas β -lactamasas. Las β -lactamasas son una causa frecuente de resistencia de las enterobacterias, especialmente en *Klebsiella*, a

las cefalosporinas de tercera generación como lo es cefotaxima (Castañeda *et al.* 2009).

La especie *Pseudomonas aeruginosa* fue registrada en los cuatro puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal tramo UNACHI, mostrando mayor resistencia a cefotaxima y ampicilina pero mostró sensibilidad con respecto a ciprofloxacina, gentamicina e imipenem. Estos datos coinciden con el trabajo de Lösch *et al.* (2005), quienes determinaron que las especies de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de aguas superficiales son sensibles a ciprofloxacina y a ceftazidina, pero contrario a nuestros resultados mostró resistencia a imipenem.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostró que la especie *Escherichia coli* es resistente a cefotaxima, ampicilina y gentamicina. Al comparar nuestros datos con el trabajo de Rivera *et al.* (2005), se observa que *E. coli*, también presentó resistencia a ampicilina, gentamicina y cefotaxima, también coinciden con Nuñez *et al.* (2012), quienes reportaron que las bacterias gramnegativas como son la *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*, fueron resistentes a ampicilina. Estos resultados difieren a los reportados por Coila, (2017), quien determinó que *Escherichia coli* y *Enterobacter sp* fueron sensibles a los antibióticos cefotaxima, cefalexina, ceftriaxona y cloranfenicol, y presentaron una respuesta intermedia a eritromicina; en contraste *Klebsiella sp*, fue sensible a cefotaxima, cefalexina y ceftriaxona e intermedia a cloranfenicol y eritromicina.

Los resultados obtenidos indican que las bacterias resistentes a antibióticos, se debe en gran parte a que estos microorganismos procedían de las aguas residuales de los hospitales. La mayoría de estas bacterias se identificaron en la salida de las aguas residuales del Hospital Regional Rafael Hernández y del Hospital Materno José Domingo de Obaldía. Las resistencias de estas bacterias radican en que ellas evolucionan frente a la presencia de antimicrobianos, gracias a su rápida replicación y la utilización de diferentes mecanismos para sobrevivir.

La resistencia bacteriana frente a ciprofloxacina fue de 18.1% de las bacterias aisladas en la quebrada. Los resultados muestran (cuadro 2) que *Klebsiella pneumoniae*, es resistente a ciprofloxacina, ampicilina y cefotaxima, si comparamos los datos con el trabajo de Méndez, (2006) que demostró que las bacterias gramnegativas aisladas de la quebrada aledaña a un hospital clase A, ubicada en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, eran resistentes a antibióticos como ampicilina, cefalotina, trimetropin sulfametoxazol, carbenicilina, nitrofurantoina, cefotaxima, cloranfenicol, amikacina, ceftriaxona, gentamicina, netilmicina y plefoxacina nos muestra resultados similares en esta investigación, además este autor señala que el mayor porcentaje de las especies aisladas corresponden a *Escherichia coli* que presentó resistencia a doce antibióticos evaluados, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Analizando nuestros resultados podemos destacar que la resistencia a antibióticos es un problema creciente en

muchos patógenos potenciales bacterianos, y que este patrón de resistencia se debe a que la quebrada San Cristóbal recibe descargas de antibióticos de hospitales aledaños.

Resistencia bacteriana a metales pesados

De los metales pesados, hay siete considerados como los principales contaminantes detectados en aguas residuales hospitalarias estos son cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel, plata y zinc (Ramos, 2013).

Según Veranes, (2013) la resistencia de las especies bacterianas a los metales pesados influye en la resistencia bacteriana a antibióticos, de esto concluimos que probablemente la resistencia encontrada en las especies bacterianas se debe a la presencia de estos metales en la quebrada San Cristóbal. La exposición de las bacterias a estos químicos, pudo permitir la selección de microorganismos que se encuentran en este ecosistema, capaces de tolerar sus efectos nocivos (Martínez *et al.* 2010)

Resistencia bacteriana al cromo

En este estudio pudo observarse que los grupos morfológicos bacterianos fueron resistentes como mínimo a la concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cuadro 3). Las CMI en bacterias gramnegativas que resistieron al Cromo estuvieron comprendidas entre 125 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

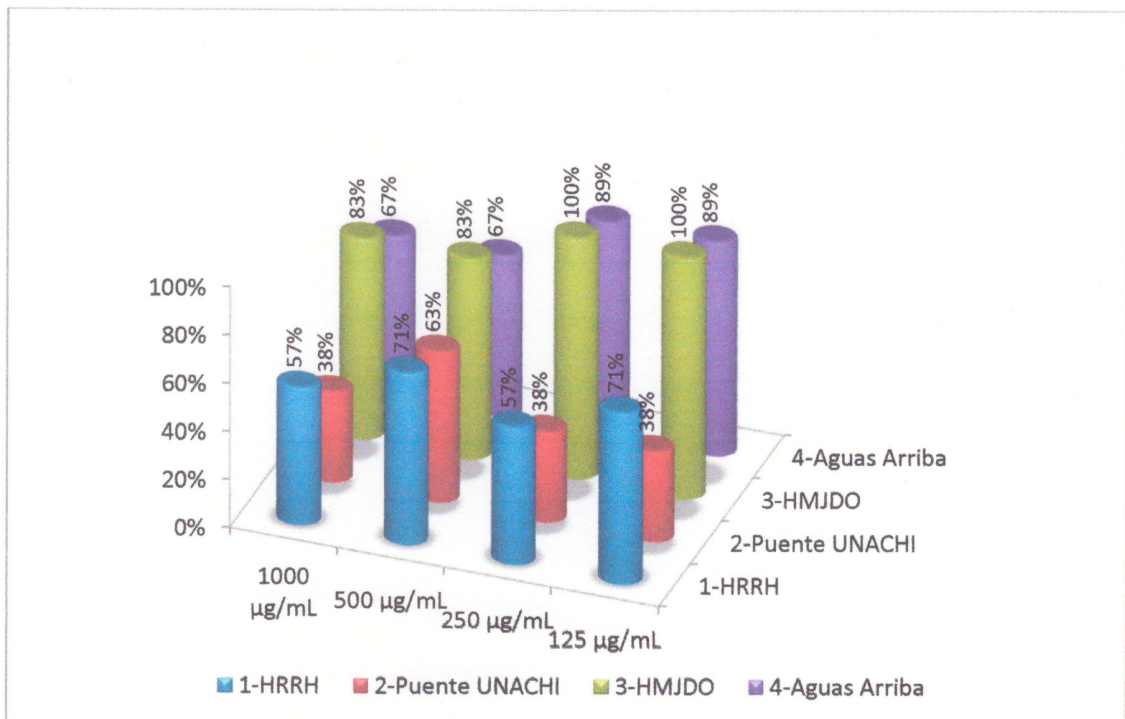


Figura 4. Porcentaje de bacterias resistentes al Cromo en los diferentes puntos de muestreo de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI. Fuente:

Saldaña, 2016.

A partir de los datos obtenidos la CMI de las bacterias aisladas se observa en el punto tres de la quebrada, en el cual 100% de las cepas mostraron resistencia al cromo en las concentraciones de 250 a 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; mientras que en el punto uno y dos, el 83% fueron resistente al cromo en las concentraciones 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 4).

Las cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter asburiae* y *Enterobacter cloacae* fueron las más resistentes al cromo, hasta una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el primer punto de muestreo de la quebrada. Se ha demostrado la resistencia a antibióticos de una biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* formando complejos con metales pesados entre los cuales se encuentra el Cromo (Anderl *et al.* 2000 Citado en Islas & Bojórquez 2011). Los datos obtenidos en este estudio difieren a los resultados de Espinoza (2005), quien reportó que especies del género *Pseudomonas* aisladas en sedimentos del río Lerma (México) mostraban resistencia al cromo en concentraciones de hasta 207 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se han reportados en varios estudios la resistencia de bacterias al cromo (Ramírez *et al.* 2009, Anderl *et al.* 2000 citado en Islas & Bojórquez 2011). Las bacterias identificadas en este estudio son capaces de resistir altas concentraciones de cromo y pertenecen a las enterobacterias. Esta resistencia se debe entre otros aspectos metabólicos, a la resistencia de su doble

membrana celular ausente en las bacterias grampositivas, así como a la capacidad de agruparse en pares o cadenas, común en los bacilos (Islas & Bojórquez, 2011).

Resistencia bacteriana al Arsénico

Las CMI de bacterias gramnegativas que resistieron al Arsénico estuvieron comprendidas entre 125 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. El 100 % de las bacterias aisladas mostraron mayor resistencia al arsénico en el punto tres de la quebrada (Figura 5).

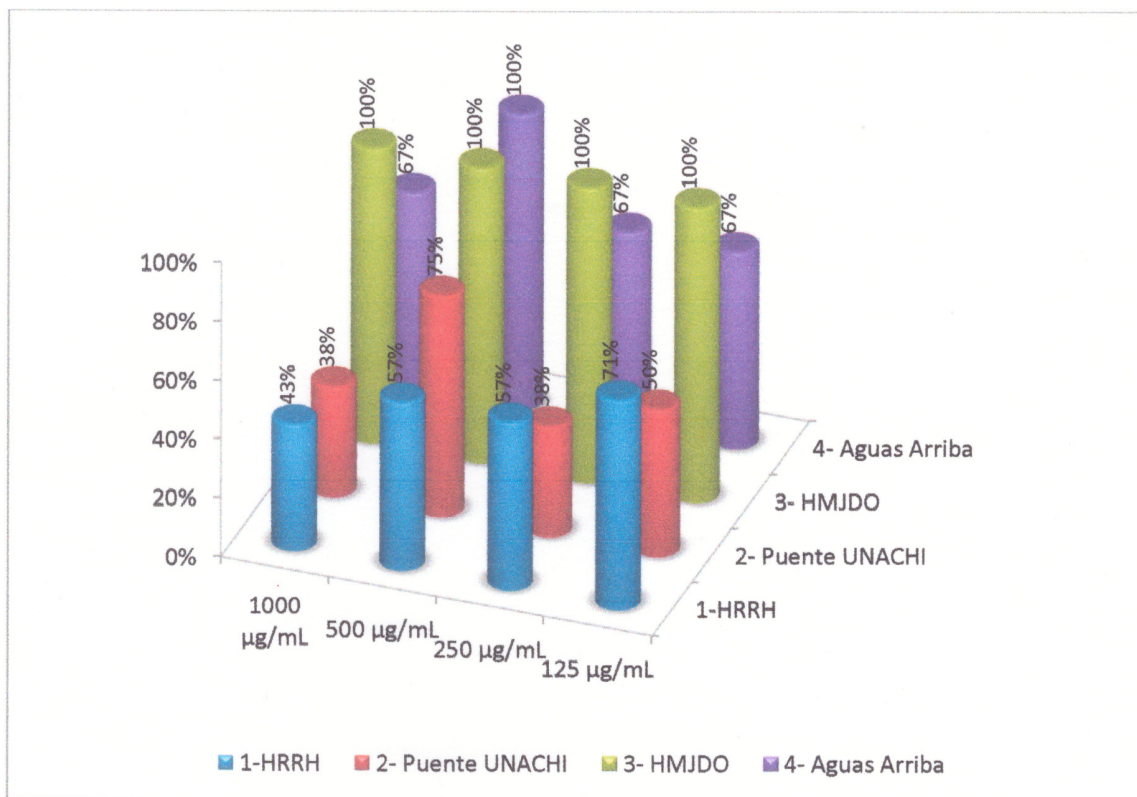


Figura 5. Porcentaje de bacterias resistentes al Arsénico en los diferentes puntos de muestreo de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI. Fuente: Saldaña, 2016.

De acuerdo a nuestros resultados las bacterias del género *Enterobacter* mostraron mayor resistencia al arsénico. Estos datos coinciden con los resultados de Campos *et al.* (2007), quienes aislaron y reportaron cepas correspondientes a los géneros *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Burkholderia* capaces de crecer a elevadas concentraciones de arsénico.

La contaminación por arsénico es muy extendida, debido a su fácil dispersión, puede penetrar el agua a través de escorrentía, por actividades humanas como

la quema de carbón y la fundición de metales industriales y, más recientemente, la industria de semiconductores y la liberación de minerales ricos en arsénico durante la extracción minera de otros compuestos (Mukhopadhyay *et al.*, 2002 citado en Rangel *et al.* 2015). El patrón de resistencia a Arsénico se debe a la presencia del operón *ars*, responsable de la reducción de As, y que el posible mecanismo de adquisición del sistema, es una transferencia horizontal de genes, vía plásmidos o transposones (Campos *et al.* 2007). Otros autores identificaron bacterias gramnegativas del género *Enterobacter* que mostraron resistencia al Arsénico en sedimentos del río Camarones (Región I-Chile) e indicaron que este patrón de resistencia se debe a la expresión de genes por parte de las bacterias que les permiten transformar el metal y de esta manera sobrevivir en este ambiente (Mellado *et al.* 2007).

Resistencia bacteriana al plomo

Las CMI de bacterias gramnegativas que resistieron al Plomo estuvieron comprendidas entre 125 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El 100% de las bacterias aisladas mostraron mayor resistencia al Plomo en el punto tres de la quebrada (Figura 6).

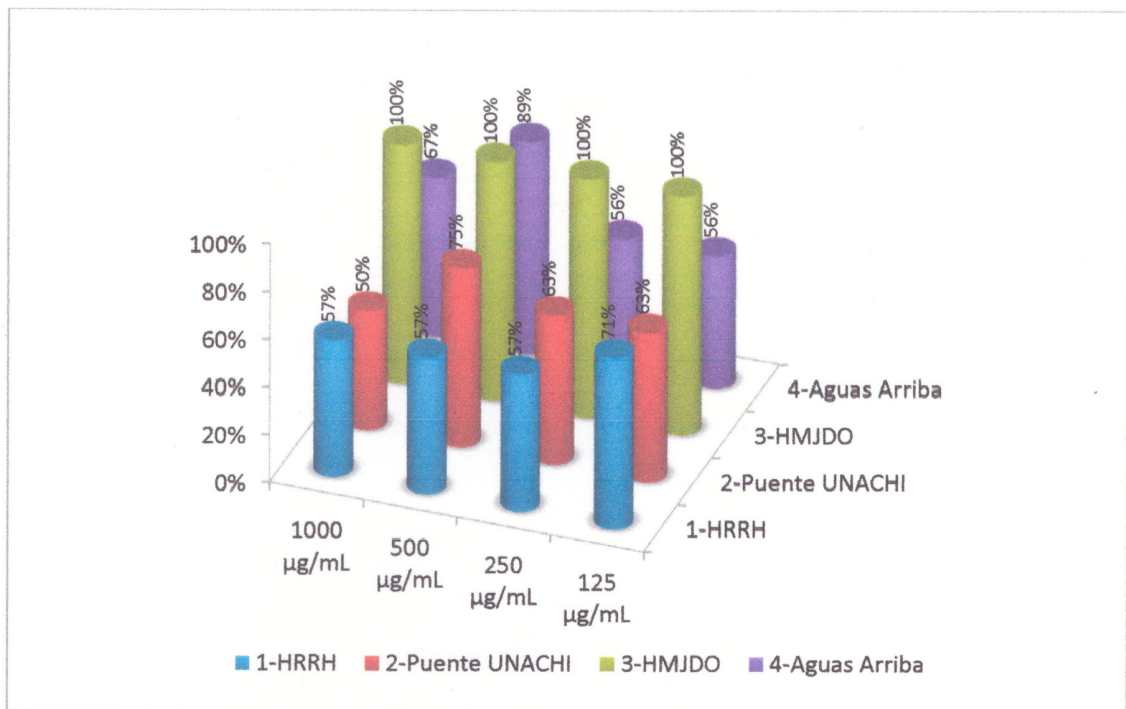


Figura 6. Porcentaje de bacterias resistentes al Plomo en los diferentes puntos de muestreo de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI. Fuente, Saldaña, 2016.

Las especies de *Klebsiella pneumoniae* mostró resistencia al Plomo hasta una concentración de 125 µg/mL. Estos datos son similares a los de Coila, (2017) quien reportó que *Klebsiella sp.*, mostró mayor resistencia al Plomo. Para Muñoz *et al.* (2012), *Klebsiella* es capaz de retener en el interior de su célula 90mg/mL de plomo lo que le permite sobrevivir en este ambiente. Las cepas aisladas mostraron resistencia a la presencia de 1000 µg/mL de plomo.

Resistencia bacteriana al mercurio

En el punto cuatro de la quebrada, las especies bacterianas mostraron mayor resistencia al Mercurio (Figura 7). Las CMI de bacterias gramnegativas que resistieron al Mercurio estuvieron comprendidas entre 12.5 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

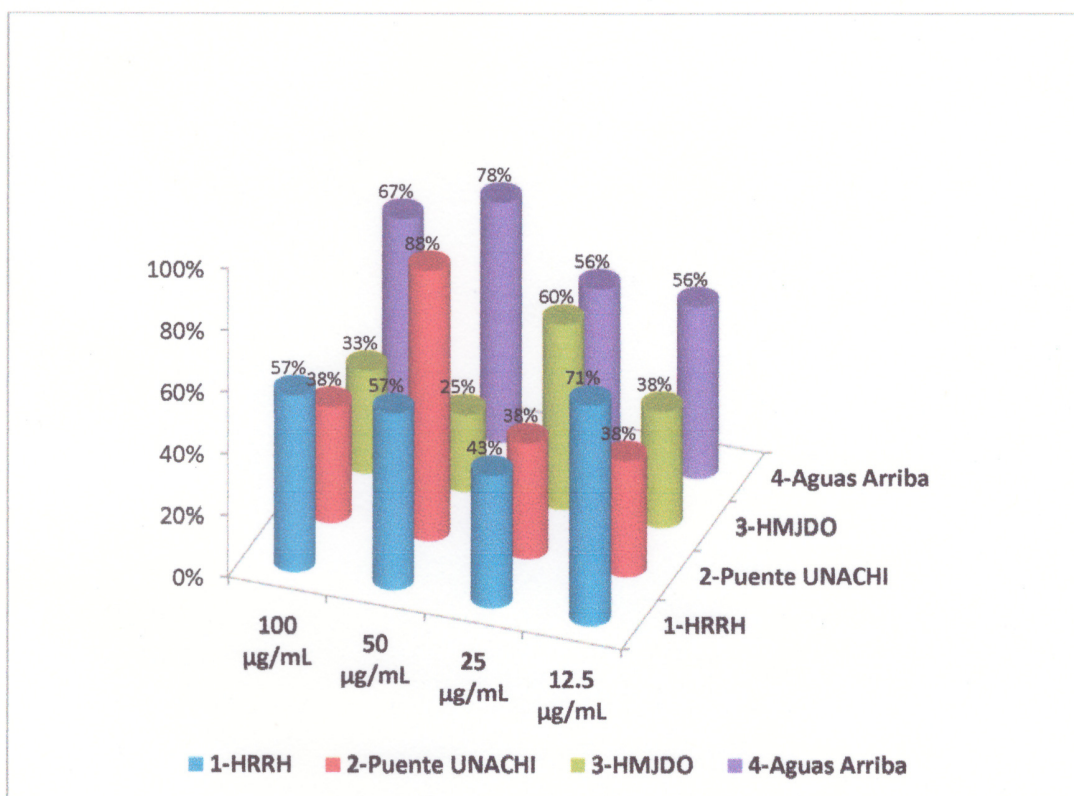


Figura 7. Porcentaje de bacterias resistentes al Mercurio en los diferentes puntos de muestreo de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI. Fuente,

Saldaña, 2016.

Las especies de *E. cloacae* aisladas en los cuatro puntos de la quebrada mostraron resistencia al Mercurio hasta una concentración del 12.5 µg/mL. Por su parte Fredrikson *et al.* (1991) reportaron que las bacterias gramnegativas son resistentes al Mercurio en concentraciones por debajo de 20 µg/mL. En este estudio se pudo observar que especie *Klebsiella pneumoniae* también mostró resistencia al mercurio, lo cual coincide con Coila, (2017) quien reportó *Klebsiella pneumoniae* mostró resistencia al mercurio. Según Villagra (2011), *Escherichia coli* es capaz de sintetizar el mercurio y se puede utilizar como un método eficaz, económico y con un impacto menor que los actuales para la desintoxicación de aguas contaminadas por mercurio. La presencia de mercurio en la quebrada, se debe posiblemente a una contaminación antropogénica que están estrechamente asociados con las descargas industriales (Nelson *et al.*, 1993).

Resistencia bacteriana al Cadmio

En el punto de tres de la quebrada se registró el mayor porcentaje de bacterias resistentes al Cadmio como mínimo a la concentración de 12.5 µg/mL (Figura 8) La concentración mínima inhibitoria en las bacterias que resistieron al Cadmio estuvieron comprendidas entre 12.5 y 100 µg/mL. En los cuatro puntos de muestreos las especies de *Enterobacter cloacae* fueron las que presentaron

mayor resistencia al Cadmio, seguidamente la especie *Klebsiella pneumoniae* quien también mostró resistencia a este metal (Cuadro 8).

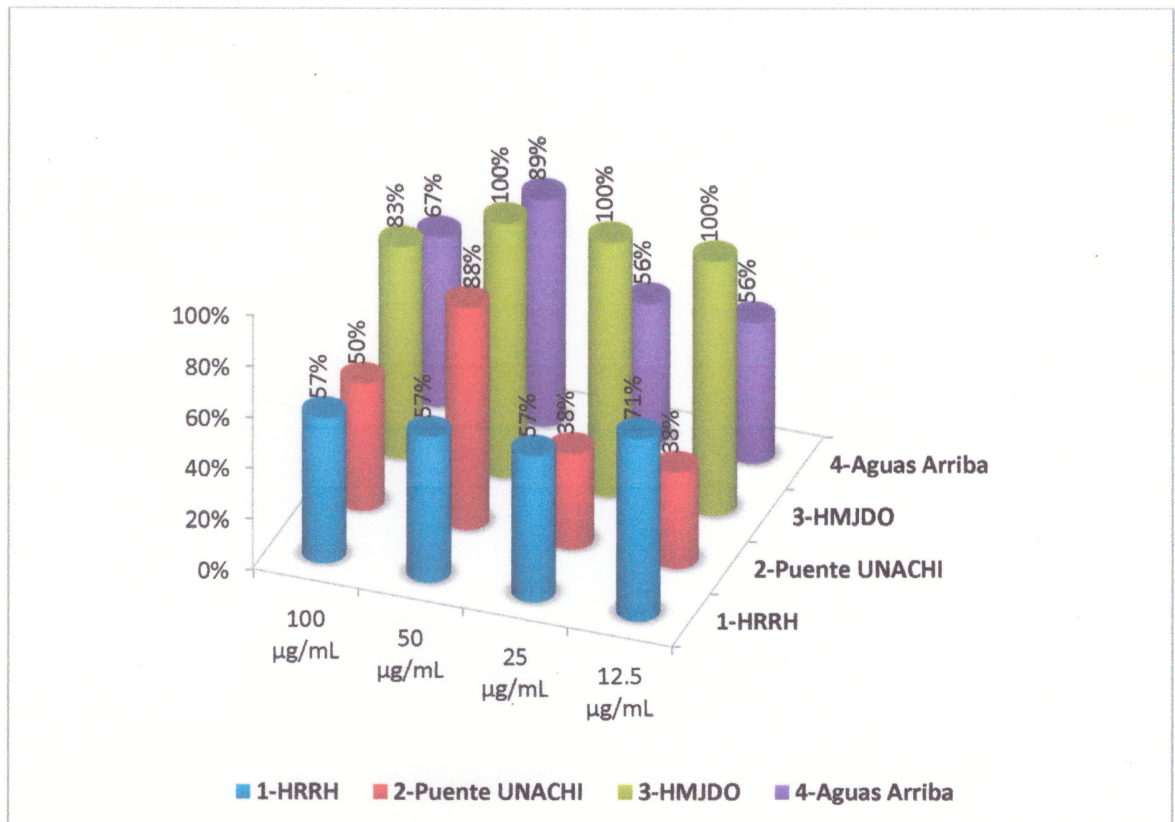


Figura 8. Porcentaje de bacterias resistentes al Cadmio en los diferentes puntos de muestreo de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI. Fuente:

Saldaña 2016.

Los datos obtenidos sobre la presencia de cadmio en la quebrada San Cristóbal no coinciden con Dupontt *et al.* (2001) quienes encontraron que las cepas de *Pseudomonas* aisladas de la playa Caimare chico (Estado Zulia-Venezuela) fueron más resistentes al Cadmio. También difieren con los datos obtenidos por

Martínez *et al.* (2010), quien reportó que bacterias del género *Pseudomonas* aisladas del río Almendares (Habana-Cuba) son resistentes al cromo.

De acuerdo a nuestros resultados se encontró que las especies de *Enterobacter cloacae* aisladas de la quebrada San Cristóbal mostraron resistencia al Pb, Hg y Cd, esto coincide con lo publicados por Coila, (2017), quien reportó que las especies de *Enterobacter* son resistentes al Pb, Hg y Cd. Este patrón de resistencia probablemente se debe a la presencia de estos metales en el agua. Cabe destacar que los puntos seleccionados son fuentes de contaminación, por las instituciones aledañas a la quebrada y esto permite la selección de bacterias capaces de tolerar sus efectos. Las bacterias utilizan diferentes mecanismos de resistencia a estos metales, como el uso de transportadores de membrana que expulsan al ambiente los iones metálicos, valiéndose de modificaciones enzimáticas para cambiar el estado redox de los elementos químicos (Cervantes *et al.* 2006) y los que incorporan los iones metálicos a la célula (Marrero *et al.* 2007), biotransformando a los metales. Esta resistencia al Pb, Hg y al Cd por parte del género *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella* se debe a los patrones de multiresistencia, presentes en sus plásmidos (Coila, 2017).

Los metales pesados presentes en aguas residuales no pueden ser degradados naturalmente, sino que permanecen en los sedimentos y son lentamente liberados en los cuerpos de agua; aun cuando se encuentre presentes en

cantidades bajas (Cañizares, 2000; Pérez *et al.*, 2002 citado en Salgado *et al.* 2012).

La contaminación ambiental por metales pesados favorece la selección de bacterias resistentes a antibióticos, cuando los genes responsables de éstas resistencias se encuentran en el mismo plásmido. La quebrada San Cristóbal recibe descargas con contaminantes químicos que causan el desarrollo de bacterias resistentes, fuente para el desarrollo de microorganismos oportunistas y por consiguiente el deterioro de la calidad del agua, con el consecuente riesgo a la biodiversidad y a la salud humana. Esta puede ser la respuesta a la relación de resistencia que existe entre los antibióticos y metales pesados, detectada en las bacterias aisladas en este estudio.

CAPÍTULO V. CONSIDERACIONES FINALES

5.1. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un total de 41 aislados microbianos de los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Proteus* y *Providencia*.
- La mayoría de las especies bacterianas aisladas de la quebrada San Cristóbal-Tramo UNACHI, pertenecen a la familia Enterobacteraceae.
- El 72,2% de las cepas aisladas, fueron resistentes a cefotaxima, 54.5% a ampicilina, 18.2 % a ciprofloxacina, 27.3 % a gentamicina, mientras que la resistencia bacteriana a los carbapenémicos representados por el Imipenem fue nula.
- La especie *Pseudomonas aeruginosa* mostró mayor resistencia a cefotaxima y ampicilina, con sensibilidad a ciprofloxacina, gentamicina e imipenem.

- De los aislados microbianos, *Enterobacter cloacae*, mostró mayor resistencia al plomo, mercurio y cadmio.
- El aislamiento bacteriano mostró que no existe una elevada presencia de microorganismos en la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.
- La resistencia bacteriana a los antibióticos causa un efecto colateral en la resistencia a metales pesados.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se debe mejorar el manejo del uso de antimicrobianos, donde se involucre los encargados de salud pública, el gobierno y la comunidad en general.
- Realizar pruebas físico-químicas en el agua de la quebrada San Cristóbal, para una mejor interpretación de los resultados de evaluación bacteriana.
- Realizar aislamientos de bacterias de aguas residuales procedentes de hospitales, para determinar su resistencia a antibióticos y confirmar su resistencia a metales pesados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Bhattacharya M., Roy S., Biswas D.; & Kumar R. 2000. *Effect of Mg (2+) ion in protein secretion by magnesium-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa and Vibrio parahaemolyticus from the coastal water of Haldia port. FEMS Microbiol. Lett.* 185(2): 151-156.

Campos A. Martinez M., Mendoza N. 2008. Quinolonas. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 51 No. 4.

Castañeda Y., López P., Figueroa Y., Fuentes J. 2009. *Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de la playa de la isla de Margarita, Venezuela.* Vol. 21 N° 1: 12-19.

Cerniglia C. 1984. *Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons.* *Adv. Appl. Microbiol.* 30: 31-51.

Correa A., Núñez M., Peña S. 2006. *Bacterias heterótrofas aisladas del lago de los Reyes Aztecas (Tlahuac) y su resistencia a diferentes antibióticos.* Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento El Hombre y su Ambiente Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, C. P. 04960.

Campos V., Valenzuela C., Alcorta M., Escalante G. & Mondaca M. 2007. *Aislamiento de bacterias resistentes a arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada Camarones, regio Parinacota, Chile.* Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Casilla 160-C. Concepción, Chile, *Gayana* 71(2): 150-155.

Crespo M. 2004. *La Lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. Colombia Médica. Vol 33 N°4 179-193.*

Chirinos J. 1999. *Los mecanismos de la resistencia bacteriana. Revista médica del c.i.e.m Perú.*

Dupontt J.; Díaz L.; Atencio L.; Pérez A. 2001. *Susceptibilidad a Hg +2 y Cd+2 en cepas bacterianas biodegradadoras de antraceno aislados de la playa Caimare Chico, estado Zulia. Maracaibo-Venezuela. Volumen 35. No. 3., pp. 252 – 258.*

Fredrickson, J., Hicks R., S.W. LI. y Brockman F. 1988. *Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. Appl. Environ. Microbiol. p. 2916-2923.*

Fuentefria B.; Ferreira A.; Gräf T.; Corção G. sin año. *Pseudomonas aeruginosa: propagación de la resistencia antimicrobiana en el efluente hospital y agua de superficie. Departamento de Microbiología. Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.*

García C. 2014. *Resistencia antibiótica de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Proteus sp., en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. Universidad de San Carlos de Guatemala.*

Gómez López, M.; Araujo Prado, M.; Díaz M.; Garrido Vázquez, J.; Sueiro, R.; Suárez, S. 2007. *El tratamiento secundario de aguas residuales como mecanismo redistribuidor de genes de resistencia en bacterias: análisis y evaluación de riesgo. Higiene y Sanidad Ambiental. Vol. 7, p. 238-250. ISSN 1579-1734. Depósito legal GR-222/2002.*

Guzmán P., Avelino, F., Rivera A., Castañeda E., Chávez E. *Resistencia a antimicrobianos y a metales pesados en cepas de Escherichia coli aisladas del Río Alseseca. Lat. De Microbiología 48(2): 203-210.*

Islas M. & Bojórquez R. 2011. *Bacterias reductoras de Cr⁺⁶ y su potencial biotecnológico. Versión impresa ISSN 0188-4999. Rev. Int. Contam. Ambient vol.27 no.3 México.*

Jordá L.; Vila A.; Lanza A.; Bonvehi P.; Nazar J.; Mikietuk A.; Labat R.; Smayevsky J. 2005. *Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. Scielo. Buenos aires-Argentina.. Acta bioquím. clín. latinoam. v.39 n.1. Versión On-line ISSN 1851-6114,*

Núñez L.; Tornello C.; Puentes N.; Moretton J. 2012. *Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. Revista Ambiente & Agua -An Interdisciplinary Journal of Applied Science. Buenos Aires, Argentina. Vol. 7, núm. 1, p. 235-243.*

Paniagua G.; Pérez E.; Vaca S.; Gonzalez S. 2003. *Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de Staphylococcus aureus. Rev. Med Hosp Gen Mex Vol. 66, Núm. 1. pp 13 - 21*

Ramos Yusibeska & Alonso Guillermina. 2011. *Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes de bacterias aisladas de ambientes naturales. Caracas Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.31 n.2 versión impresa ISSN 1315-2556*

Veranes Oiris. 2013. *Evaluación de la resistencia a antibióticos y a metales pesados en aislados bacterianos del río almendares. Habana-Cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 44, No. 3, pp. 35-37.*

Marrero-Coto, Jeannette; Díaz-Valdivia, Arelys; Coto-Pérez, Orquídea. *Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 41, núm. 1, enero-abril, 2010, pp. 67-78 Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba.

Mellado C., Badilla C., Escalante G., Campo V. & Mondaca M. 2007. *Transformación de arsénico por bacterias aisladas de sedimentos enriquecidos con el metaloide*. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile, Casilla 160-C.

Loera P., López C., Romero C., Luévanos M, Balagurusamy N. 2016. *Mecanismo de Resistencia Intrínseca y Adquirida a antibióticos en bacterias*. Laboratorio de Biorremediación de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Coahuila.

López O., León J., Jiménez M., Chaidez C. 2009. *Detección y resistencia a antibióticos de Escherichia coli y Salmonella en agua y suelo agrícola*. versión impresa ISSN 0187-7380. Rev. fitotec. mex vol.32 no.2 Chapingo.

Lujan D. 2014. *Pseudomona aeruginosa: un adversario peligroso*. Versión impresa ISSN 0325-2957. Acta bioquím. clín. latinoam. vol.48 no.4 La Plata.

Espinoza, M., Vázquez, J., Bojorquez, R., Hernández, I. 2015. *Aislamiento de bacterias resistentes y transformadoras de cr(vi) y metil paration*. Centro Interamericano de Recursos de Agua. México.

Vargas T. & Villazante L.2014. *Clasificación de los microorganismos*. Revista de Actualización. Version impresa ISSN 2304-3768. Med V.44.

Veranes O. 2013. *Evaluación de la resistencia a antibióticos y a metales pesados en aislados bacterianos del río almendares*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 44, No. 3, pp. 35-37.

Villagra P. Una bacteria capaz de absorber y retener mercurio. 2011. <https://ciencinante.wordpress.com/2011/10/15/una-bacteria-capaz-de-metabolizar-mercurio/>

ANEXOS



Figura 9. Salida de aguas residuales del Hospital Regional Rafael Hernández. Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 10. Puente UNACHI. Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 11. Salida de agua residuales del Hospital Materno José Domingo de Obaldía. Fuente: Saldaña, 2015



Figura 12. Agua arriba, límite tramo Universidad autónoma de Chiriquí.
Fuente: Saldaña, 2105.



Figura 13. Muestras de agua (en frascos estériles) de la quebrada San Cristóbal. Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 14. Siembra de las muestras de agua, en caldo tioglicolato.

Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 15. Siembra por estrías en agar Sangre y agar Macconkey

Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 16. Sistema automatizado Vitek®2. Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 17. Tarjetas reactivas del Sistema Vitek®2.

Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 18. Aislamiento bacteriano en placas de agar Müeller-Hinton.

Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 19. Perforación de pozos en placas de agar Müller –Hinton.

Fuente: Saldaña, 2015.

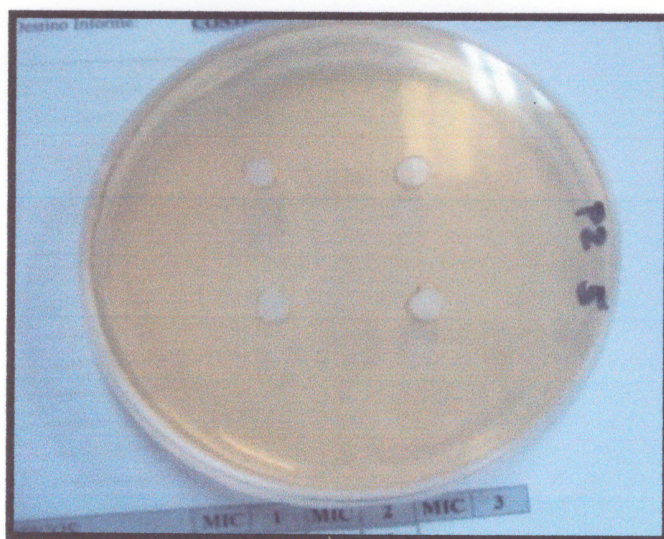


Figura 20. Muestra de los pozos perforados. Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 21. Preparación de las diferentes concentraciones de metales pesados. Fuente: Saldaña, 2015.



Figura 22. Resistencia de las bacterias a los metales pesados.

Fuente: Saldaña 2015.

Cuadro 3. Actividad de los antibióticos frente a microorganismos Gram-negativos.

Microorganismos	Antibióticos				
	Cefotaxime	Ampicilina	ciprofloxacina	Gentamicina	Imepenem
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S
<i>Enterobacter asburiae</i>	R	S	S	S	I
<i>Enterobacter cloacae spp cloacae</i>	R	S	S	S	I
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S
<i>Pseudomona fluorescens</i>	S	S	S	S	I
<i>Enterobacter gergoviae</i>	S	S	S	S	I
<i>Acinetobacter iwofii</i>	R	R	R	R	I
<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S	S
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	S	R	S

S=sensible, I=intermedio, R=resistente. Fuente: Saldaña, 2016.

Cuadro 4. Resistencia bacteriana a metales pesados en bacterias Gram negativas.

Especie	CMI (Cr ⁺⁴) µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125 *
<i>Citrobacter freundii</i>	125 *
<i>Enterobacter gergoviae</i>	125 *
<i>Enterobacter asburiae</i>	125 *
<i>Proteus mirabilis</i>	125 *
<i>Escherichia coli</i>	125 *
<i>Providencia stuartii</i>	-
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	125 *
<i>Enterobacter cloacae</i>	125 *

CMI: Concentración mínima inhibitoria del cromo: * mínimo.

Cuadro 5. Resultados de la resistencia bacteriana al Cromo en los diferentes puntos de muestreos de la quebrada San Cristóbal, tramo UNACHI.

Sitio	Especies	Concentración µg/ml			
		1000	500	250	125
1	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	S	S	S
	<i>Acinetobacter iwofii</i>	S	S	S	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	S	S
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	S	R	S	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S
	<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	S	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	R
3	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	R	R	R	R

	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	R	R
4	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R
	<i>Providencia stuartii</i>	S	S	S	S
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R

Cuadro 6. Resultados de la resistencia bacteriana al Arsénico en los diferentes puntos del muestreo de la quebrada San Cristóbal.

Sitio	Especies	Concentración µg/ml			
		1000	500	250	125
1	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	S	S	S
	<i>Acinetobacter iwofii</i>	S	S	S	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S	S	R
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	S	R	S	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R	

3	<i>Pseudomona fluorescens</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Proteus mirabilis</i>	S	R	S	S
	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	S
	<i>Providencia stuartii</i>	S	R	S	S
4	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R

Cuadro 7. Resultados de la resistencia bacteriana al Plomo en los diferentes puntos del muestreo de la quebrada San Cristóbal.

Sitio	Especies	Concentración µg/ml			
		1000	500	250	125
1	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	S	S	S
	<i>Acinetobacter iwofii</i>	S	S	S	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	R	S	S
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	S	S	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	S	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
3	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R

4	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	S	S	S
	<i>Proteus mirabilis</i>	S	R	S	S
	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	S
	<i>Providencia stuartii</i>	S	R	S	S
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R

Cuadro 8. Resultados de la resistencia bacteriana al Mercurio en los diferentes puntos de muestreos

Sitio	Especies	Concentración µg/ml			
		100	50	25	12.5
1	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	S	S	S
	<i>Acinetobacter iwofii</i>	S	S	S	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	R	S	S
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	S	R	S	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	S	R	R	R
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S	R	R
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	S	S	R	R

4	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	S	S	S
	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S
	<i>Enterobacter coli</i>	S	R	S	S
	<i>Providencia stuartii</i>	S	R	S	S
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R

Cuadro 9. Resultados de la resistencia bacteriana al Cadmio en la quebrada San Cristóbal.

Sitio	Especies	Concentración µg/ml			
		100	50	25	12.5
1	<i>Escherichia coli</i>	S	S	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	S	S	S
	<i>Acinetobacter iwofii</i>	S	S	S	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	R	S	S
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	S	R	S	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	S
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	S	S	S
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	S	R	S	S
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter coli</i>	R	R	R	R
3	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	R	R	R
	<i>Pseudomona fluorescens</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R

	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	R	R	R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R
	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter asburiae</i>	R	S	S	S
	<i>Proteus mirabilis</i>	S	R	S	S
4	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	S
	<i>Providencia stuartii</i>	S	R	S	S
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R