

## Indicadores de contaminación microbiológica de Escherichia coli en el lago de Güija

Indicators of microbiological contamination  
of Escherichia coli in Güija lake.

### **Mildred Amparo Sandoval de Avelar**

Maestra en Salud Pública por la Universidad de El Salvador  
(UES)

Licenciada en Química y Farmacia por la Universidad de El Salvador  
(UES)

Investigadora Universidad Autónoma de Santa Ana  
mildred.sandoval@unasa.edu.sv  
orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8509-2335>

### **Adán Alexis Acosta Martínez**

Master en control de las enfermedades infecciosas por la Universitat de Barcelona  
(UB)

Licenciado en Laboratorio Clínico por la Universidad Autónoma de Santa Ana  
(UNASA)

Investigador de la Universidad Autónoma de Santa Ana  
Investigador2@unasa.edu.sv  
orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6378-5739>

Fecha de recepción: 15 de diciembre de 2022.  
Fecha de aceptación: 20 de mayo 2023.

**Resumen:**

Existen estudios que han registrado la confluencia de resistencia bacteriana en distintos cuerpos de agua donde confluyen la presencia de bacterias y metales pesados, este es el caso del lago de Güija, cuyo comportamiento se ha registrado desde 2019 por lo que, en esta oportunidad se identificaron indicadores de contaminación microbiológica y resistencia bacteriana de *Escherichia coli*. La investigación fue de tipo y alcance descriptivo, realizada durante 2021. La extracción de ADN de cepas de *Escherichia coli* se realizó con el Kit Pure Link Genomic DNA según el protocolo de purificación rápida de ADN de Invitrogen para muestras bacterianas. Los perfiles de susceptibilidad se obtuvieron utilizando el método de difusión de disco (Kirby-Bauer) como es descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute. Se aislaron once cepas de las diferentes muestras tratadas, constatando que cumplían con las características esperadas, tanto en morfología como en características en medios de cultivo diferencial. Todas las cepas provenían del sector Las Conchas y La Barra. En las pruebas moleculares no se encontró la presencia de ningún serotipo de *E. coli* O157:H7. Una cepa fue resistente a la Gentamicina, dos a Ceftazidima, tres a Levofloxacin, 3 a Aztreonam, dos a Ciprofloxacina, tres a Trimetoprim y dos a Nitrofurantoína, siendo estos indicadores de resistencia a betalactámicos; ninguna de las cepas aisladas mostró resistencia a Imipemem, lo que completaría el perfil fenotipo de expresión de resistencia de las cepas aisladas.

**Palabras claves:** *Indicadores; Escherichia coli; contaminación del agua; genes de resistencia.*

**Abstract:**

*There are studies that have recorded the confluence of bacterial resistance in different bodies of water where the presence of bacteria and heavy metals converge. This is the case of lake Güija, whose behavior has been recorded since 2019, therefore, on this occasion, indicators of microbiological contamination and bacterial resistance of Escherichia coli were identified. It was a descriptive type and scope of research, carried out during 2021. DNA extraction from Escherichia coli strains was performed with the Pure Link Genomic DNA Kit according to the Invitrogen rapid DNA purification protocol for bacterial samples. Susceptibility profiles were obtained using the disk diffusion (Kirby-Bauer) method as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute. Eleven strains from the different treated samples were isolated, verifying that they met the expected characteristics, both in morphology and in characteristics in differential culture media. All the vines came from the Las Conchas and La Barra sector. The molecular tests did not find the presence of any serotype of E. coli O157:H7. One strain was resistant to Gentamicin, two to Ceftazidime, three to Levofloxacin, 3 to Aztreonam, two to Ciprofloxacin, three to Trimethoprim and two to Nitrofurantoin, these being indicators of resistance to beta-lactams; none of the isolates showed resistance to imipemem, which would complete the resistance expression phenotype profile of the isolates.*

**Keywords:** *Indicators, Escherichia coli, water contamination; resistance genes.*



## Introducción

De acuerdo al Programa Global de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, el agua es un líquido inorgánico, inodoro, insípido incoloro en pequeñas cantidades y verdoso en grandes masas. Químicamente, es una combinación de hidrógeno y oxígeno; forma la lluvia, las fuentes, los ríos, los lagos y los mares. De todos los recursos naturales, el agua, reviste mayor importancia, debido a que se emplea con fines domésticos, industriales y agrícolas, también para la pesca, la producción de energía, la navegación fluvial y marítima. El agua superficial forma los lagos, ríos, mares y océanos, (Simpson, 2007). El agua es el hábitat de diversos organismos vivos, por lo que cuando se habla de indicadores microbiológicos de la calidad del agua, se hace referencia a los organismos que tienen un comportamiento similar a los microorganismos patógenos cuya procedencia, concentración, hábitat y reacción a factores externos, son producto de la interacción humana con el ambiente natural. Estos indicadores deben facilitar el análisis y ser económicamente aceptables para su utilización habitual, se requiere no solo la identificación, sino también la cuantificación de estos microorganismos por índices o intervalos que califiquen la calidad del agua (Akiyama, Savin, 2010). Con relación a lo anterior, los indicadores deben cumplir con dos requerimientos: 1) estar ausentes en agua no contaminada y 2) mantener una correlación de su presencia en un grado aceptable en grado de índice.

A nivel internacional, existen estudios que han registrado la confluencia de resistencia bacteriana en distintos cuerpos de agua donde confluyen la presencia de bacterias y metales

pesados, tanto en agua como en sedimento de cuerpos lacustres. En el caso del lago de Güija, de acuerdo a Sandoval y Cárdenas (2019), se evidenció que el arsénico y el plomo están presentes en niveles mayores que el cadmio y el mercurio, especialmente en el agua y fondo del lago (sedimento), lo cual puede estar relacionado con el origen volcánico del mismo, u otras causas antrópicas, como la agricultura y la ganadería. Asimismo, la presencia de *Escherichia coli* se cuantificó en niveles fluctuantes en los distintos períodos analizados. Esta bacteria está relacionada con la contaminación fecal que es el principal impulsor de los genes de resistencia a los antibióticos (Wisner, 2003).

Además de lo anterior, los niveles de nutrientes encontrados en el agua, especialmente los nitratos, nitritos y amonio, favorecen la multiplicación microbiana en ese ecosistema, lo cual vuelve al lago de Güija, un ambiente propicio para encontrar genes de resistencia en esas bacterias.

La *Escherichia coli* es una bacteria establecida como indicadora de contaminación fecal (Kaper, 2005) de alimentos, bebidas, y agua. Se debe usar el Número Más Probable (NMP) para definir los Límites Máximos Permisibles (LMP), siendo esta una bacteria comparada por índices o intervalos. Para cumplir el segundo indicador, se buscó el serotipo O157:H7, de importancia en salud pública. Las bacterias patógenas y de ambientes libres junto con genes de resistencia a antibióticos han sido reportadas en diversos ambientes hospitalarios; sin embargo, la amplia difusión debido a la naturaleza de sus portadores (seres humanos, animales de granja) indica que su presencia en ecosistemas naturales puede ser alta, pero también induce la idea alarmante



de una diseminación antinatural, causada por la presión selectiva del impacto de las actividades humanas en el ambiente (Zheng, 2011).

En relación a la problemática expuesta, se desarrolló la investigación con la finalidad de evaluar la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en bacterias coliformes que contaminan el lago de Güija, y determinar cuál es su perfil de resistencia, debido a que estos genes, están considerados como los propios contaminantes, son de interés ambiental mundial y una preocupación importante para la Organización Mundial para la Salud.

### **Metodología**

Esta fue una investigación de tipo y alcance descriptivo con diseño transversal, realizada en 2021, el muestreo se realizó por conveniencia e incluyó muestras de 1 litro de agua de 5 puntos georreferenciados en el lago, la toma de muestras de agua se realizó en horas diurnas, tomándose entre las 8:00 am y las 12:00 md, a 0.5 m de profundidad, repartidas así: 500 ml en bolsas de transporte estériles y 500 ml en frascos de polietileno de alta densidad. Posteriormente las muestras se conservaron bajo condiciones de luz y temperatura controlada para analizar la resistencia bacteriana mediante técnicas de biología molecular en el laboratorio de investigación de la universidad.

La extracción de ADN de cepas de *Escherichia coli* se realizó con el Kit Pure Link Genomic DNA según el protocolo de purificación rápida de ADN de Invitrogen para muestras bacterianas, posterior al proceso el ADN fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. El proceso para demostrar la presencia de resistencia bacteriana se esquematiza en la figura 1.



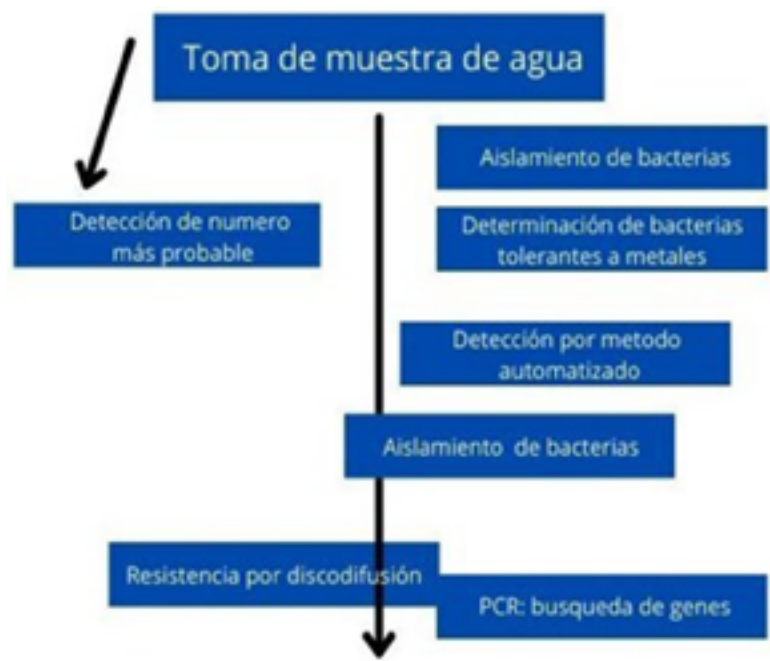


Figura 1. Esquema de procedimiento metodológico.

A partir de la siembra aislada en medio agar sangre de cordero al 5% de 24 horas y previamente identificada, se realizó la suspensión en solución salina obteniéndose una concentración de bacterias equivalente a 0.5 en la escala McFarland, para demostrar la resistencia bacteriana. Asimismo, los perfiles de susceptibilidad microbiana se obtuvieron utilizando el método de difusión de disco (Kirby-Bauer) como es descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute.

Los antibióticos incluidos en los sensibilizadores fueron Aztreonam (ATM), Amoxicilina (AML), Ceftazidima (CF), Ciprofloxacina (CP), Trimetoprim (TM), Nitrofurantoína (F) y Gentamicina (CN),

de acuerdo al Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos. (EUCAST 2022). Y se clasificaron según la clasificación establecida vigente. Como cepas para el control de calidad se utilizaron las de *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606TM) y *Escherichia coli* (ATCC® 25922TM).

Además de la determinación de mecanismos de resistencia y para elaborar un adecuado control se realizó la identificación de fenotipos de resistencia mediante cultivos cromogénicos para determinar posibles reservorios ambientales del microorganismo y el análisis de sus mecanismos de transmisión. Tabla 1.

**Tabla 1.**

## Genes de resistencia

Determinación	Frente	Reverso	pb	Fuente
tet(A)	GCTACATCCTGCTT GCCTTC	TTGCCTATGTACAGCT AATCC	210	Ng et al., 2001
tet(B)	TACGTGAATTTATT GCTTCGG	ATACAGCATCCAAAG CGCAC	206	Ng et al., 2001
tet (C)	FCTTGAGAGCCTTC AACCCAG	ATGGTCGTCATCTAC CTGCC	418	Ng et al., 2001
bla-CTX-M	F CGCTTTGCGATGTG CAG	ACCGCGATATCGTTG GT	544	Edelstein et al., 2003
TEM-1	ATAAAATTCTTGA AGACGAAA	CATAGATCGCCGTGA AGAGG	1076	Mabilat and Goussard, 1993
Bla-OXA	GTCTTTCGAGTACG GCATTA	ATTTTCTTAGCGGCA ACTTAC	720	Vahaboglu <i>et al.</i> , 1998

**Nota:** descrita por varios autores tomados según congruencia con la investigación y que fueron verificados. Adaptado de Amarachukwu O. and A. Ibekwe (2020) y Yang, J., Ju, Z., Yang, Y., Zhao, X., Jiang, Z., Sun, S. (2019).



Para las muestras de E. coli, se evaluó la presencia del serotipo O157:H7 y otros patógenos como se describe en la tabla 2.

**Tabla 2.**

**Determinación de grupos patógenos**

Determinación	Gen	F	R	pb
E.coli serogrupo O157	rfbE	CGGACATCCATGTGA TATGG	TTGCCTATGTACAGCTAAT CC	259
E. coli serogrupo H7	fliC	GCGCTGTCGAGTTCTA TCGAGC	CAACGGTGACTTTATCGCC ATTCC	625

**Nota:** cebadores utilizados para la reacción molecular. Adaptado de Ranjbar, R., Masoudimanesh, M., Dehkordi, F., Jonaidi-Jafari, N., Rahimi, E. (2017).

La investigación por no estar relacionada con muestras biológicas humanas ni contacto con personas en términos de salud, no fue sometida a evaluación ética previo a la recolección de muestras; sin embargo, con fines de autorización y publicación se solicitó al Ministerio de Medioambiente y Recursos Naturales, la respectiva solicitud de recolecta de muestras de agua, otorgándose el permiso bajo la resolución MARN-DEB-GVS-AIMA-082-2021 del veintitrés de noviembre de 2021.

**Resultados**

Se aislaron once cepas de interés de las diferentes muestras tratadas según lo descrito, constatando que cumplían con las características esperadas, tanto en morfología como en características en

medios de cultivo diferencial. Todas las cepas provenían del sector Las Conchas y La Barra.

En las pruebas moleculares no se encontró la presencia de ningún serotipo de E. coli O157:H7, la búsqueda de este patógena es importante ya que causa enfermedades graves en humanos. El ganado saludable y diferentes animales son un reservorio de E. coli O157:H7, también sobrevive bien en el medio ambiente, por lo que las características de los puntos de muestreo son propicias para su búsqueda, por lo que, a pesar de no haberse encontrado, no se puede descartarse su posible presencia, pudiendo considerarse el aumento de muestreos en nuevos abordajes o la inclusión de otros métodos de enriquecimiento específicos para esta bacteria en estudios posteriores.



Los resultados de antibiograma no representan un indicativo diagnóstico para este estudio, y se usaron como un marco comparativo para describir el gen detectado, según los resultados obtenidos; 1 cepa fue resistente a la Gentamicina, 2 Ceftazidima, 3 Levofloxacin, 3 Aztreonam, 2 Ciprofloxacina, 3 a Trimetoprim, 2 a Nitrofurantoína, siendo estos, indicadores de resistencia betalactámicos. Ninguna de las cepas aisladas mostro resistencia a Imipemem, lo que completaría el perfil fenotipo de expresión de resistencia de las cepas aisladas. Ver tabla 3

**Tabla 3.**

**Antibiogramas realizados a las cepas aisladas.**

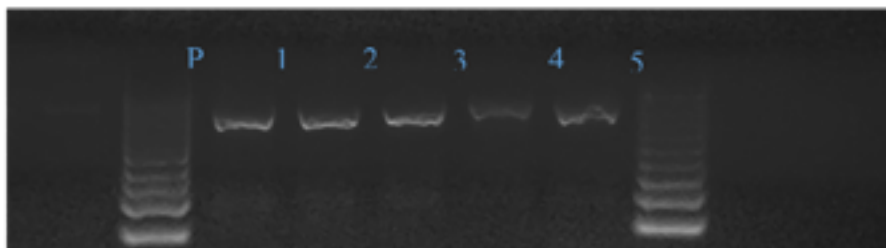
Antibiótico	Punto de corte resistente	Resistente	Sensible
Gentamicina*	$\leq 12$	1	11
Imipenem	$<13$	0	11
Ceftazidima	$\leq 14$	2	9
Levofloxacin	$<13$	3	8
Amoxicilina	$<15$	2	9
Aztreonam	$\leq 15$	3	8
Nitrofurantoína	$\leq 14$	2	9
Ciprofloxacina	$\leq 15$	2	9
Trimetoprim	$\leq 10$	3	8

**Nota:** puntos de corte tomados de diferentes fuentes en base a la búsqueda de resistencia en aguas residuales. Adaptado de: L. Jakobsen, Dandvang, D., Jensen, V., Seyfarth, A., Frimodt-Moller, N., Hammerum, A. (2007) y Fröding, I., Vondracek, M., Giske, C. (2017).





En la tipificación molecular de genes de resistencia, todos los genes fueron negativos a excepción del Gen TEM-1.



En cuanto a los resultados moleculares 5 de las cepas de Escherichia coli aisladas, amplificaron para el gen TEM-1, por lo que se ha determinado su presencia por repetición de las amplificaciones, los productos de PCR (amplicones) fueron del tamaño esperado, de aproximadamente 1078pb para los genes TEM-1 según lo esperado (tabla 2). Todas las cepas resistentes a algún antibiótico amplificaron al gen TEM-1.

## Discusión

En base a los hallazgos, se recomienda realizar un estudio a gran escala, ya que hay suficiente evidencia del cruce multifactorial de la resistencia a los microbianos en ambientes impactados por la presencia de metales pesados como es el caso del lago de Guija.

Las betalactamasas son enzimas bacterianas muy estudiadas y han sido identificadas por ser capaces de hidrolizar los antimicrobianos betalactámicos, inactivándolos y haciéndolos menos inefectivos. Las enzimas de espectro

extendido (BLEE) están entre las de mayor relevancia clínica entre las cuales se encuentra el gen encontrado TEM-1. Genéticamente TEM-1 es una enzima de 262 aminoácidos que hidroliza el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos (Hyone-Myong Eun, 1996).

Los mecanismos de resistencia que estas cepas pueden ser responsables del fenotipo resistente representado en los antibiogramas, algunos antibióticos resistentes se pueden explicar por la presencia del genotipo TEM; sin embargo, para asegurar que estamos frente a un tipo específico de BLEE TEM es necesario la secuenciación, siendo esta una limitación muy importante en el trabajo realizado.

Los medios acuáticos contaminados, proporcionan condiciones diferentes y presión selectiva sobre los microorganismos que habitan en él. Los estudios ambientales tienen que ir relacionados con el conocimiento periódico y actualizado de los patrones de sensibilidad antibiótica de un área de salud, debido a que se puede establecer una resistencia cruzada o bien



factores ambientales que crean o agudizan el problema, los estudios favorecerían la elección de un tratamiento empírico eficaz ya sea para el área de salud, o para el uso de sustancias químicas que aumenten la resistencia de las bacterias en medios acuáticos.

Entre compartimentos acuáticos se ha estudiado y confirmado que la propagación de la resistencia a los antibióticos entre las comunidades bacterianas no resistentes mediante procesos de transferencia horizontal de genes, la discusión de la transferencia horizontal de genes se centra en el papel probable del plásmido conjugativo o el intercambio de transposones, no está claro como este efecto se pueda estar desarrollando en el lago de Güija como si tiene respuesta en fuentes que reciben aguas residuales (Dodd, 2012) pero si existe la evidencia de otros contaminantes descritos por otros autores.

## Conclusiones

Se detectó la amplificación del gen TEM-1 este se ha descrito en muestras hospitalarias en bacterias resistentes a betalactámicos, otras investigaciones han reportado la presencia de este en bacterias aisladas de ambiente libre (Aldalise 2010), no se puede dar explicación de su presencia en este estudio; sin embargo, hay que tomar en cuenta que existe suficiente evidencia de presión selectiva que podrían ejercer algunos metales pesados en los ambientes acuáticos los cuales han sido encontrados en investigaciones pasadas en este lago, también se podrían considerar las comunidades cercanas como fuente de desecho de bacterias fecales al lago,

lo cual explicaría también la presencia de esta clase de genotipos.

El 45% de las cepas aisladas (5 de 11) tenían el Gen TEM-1 debido a que las cepas aisladas provenían de las Conchas y la Barra, en cuanto al antibiograma algunos antibióticos betalactámicos registraron lectura de resistencia en la prueba de disco difusión.

En cuanto a los indicadores de contaminación fecal, aunque no se encontraron patógenos estrictos como la *Escherichia coli* H057, en la zona existe presencia de organismos reservorios, por lo que en nuevos abordajes conviene aumentar la cantidad de zonas de muestreo e incluir otros métodos de enriquecimiento específicos ya que este serotipo es considerado un indicador de la calidad microbiológica del agua de ecosistemas como el del lago de Güija.

La época lluviosa registró los niveles más altos de coliformes totales en los sitios Las Conchas y Azacualpa, mientras que los niveles de *Escherichia coli* siempre persistieron altos en El Desagüe, lo que indica arrastre de sustancias por la corriente provocando esta situación.

El 45% de las cepas aisladas (5 de 11) tenían el Gen TEM-1 debido a que las cepas aisladas provenían de Las Conchas y La Barra, en cuanto al antibiograma algunos antibióticos betalactámicos registraron lectura de resistencia en la prueba de disco difusión.

## Agradecimientos

Los investigadores agradecen al señor Marcelo Hernández Aldana por el apoyo recibido para la logística en la toma de muestras en el lago.



## Referencias bibliográficas

- Akiyama, T.; Savin, M. (2010). Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream. *Sci. Tot. Environ.* 408: 6192–6201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.055>
- Aldalise Lago (2010). Enterobacterias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43 (4) Ago. Recuperado de: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/JkWvkv6B7gjX7JJpPKVvHHzr/?lang=pt>
- Amarachukwu O. and A. Ibekwe (2020). Antibiotic Resistance Genes Occurrence in Wastewaters from Selected Pharmaceutical Facilities in Nigeria 12. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/342728813\\_Antibiotic\\_Resistance\\_Genes\\_Occurrence\\_in\\_Wastewaters\\_from\\_Selected\\_Pharmaceutical\\_Facilities\\_in\\_Nigeria](https://www.researchgate.net/publication/342728813_Antibiotic_Resistance_Genes_Occurrence_in_Wastewaters_from_Selected_Pharmaceutical_Facilities_in_Nigeria)
- Dodd, M. (2012). Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of environmental monitoring: JEM*, 14 7, 1754–71. DOI: 10.1039/c2em00006g
- Fröding, I., Vondracek, M., Giske, C. (2017). Rapid EUCAST disc diffusion testing of MDR Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: inhibition zones for extended-spectrum cephalosporins can be reliably read after 6 h of incubation, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 72, Pages 1094–1102. Recuperado de: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw515>
- Hyone-Myong Eun (1996). *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*. Beta Lactamase TEM 1. Academic Press.
- Kaper J.B. (2005). Pathogenic Escherichia coli. *Int. J. Medical Microbiol.* 295 (1): 355–356.
- L. Jakobsen, Dandvang, D., Jensen, V., Seyfarth, A., Frimodt-Moller, N., Hammerum, A. (2007). Gentamicin susceptibility in Escherichia coli related to the genetic background: problems with breakpoints. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1463425X>
- Ranjbar, R., Masoudimanesh, M., Dehkordi, F., Jonaidi-Jafari, N., Rahimi, E. (2017). Shiga (Vero)-toxin producing Escherichia coli isolated from the hospital foods; virulence factors, o-serogroups and antimicrobial resistance properties. Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0163-y>



- Sandoval, M. Cárdenas, J. Universidad Autónoma de Santa Ana. (2019). Parámetros fisicoquímicos, ambientales y microbiológicos que inciden en la pesca y acuicultura en el lago de Güija, Metapán Santa Ana. Recuperado de [http://editorial.unasa.edu.sv/?fbclid=IwAR2ziXbN\\_KZheoK06M\\_ufQmr2K6axs91ugCdwCjJPCAnL8P0JZJZKsBGWOo#](http://editorial.unasa.edu.sv/?fbclid=IwAR2ziXbN_KZheoK06M_ufQmr2K6axs91ugCdwCjJPCAnL8P0JZJZKsBGWOo#)
- Simpson, D. (2007). Informe Anual del Programa Global de Naciones Unidas para el Medio Ambiente 2007. ONUN. Recuperado de: [www.unep.org](http://www.unep.org).
- Yang, J., Ju, Z., Yang, Y., Zhao, X., Jiang, Z., Sun, S. (2019). Serotype, antimicrobial susceptibility and genotype profiles of Salmonella isolated from duck farms and a slaughterhouse in Shandong province, China. BMC Microbiol 19, 202. Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1570-z>
- Zheng, S.; Qiu, X.; Chen, B.; Yu, X. (2011). Freestone Antibiotics pollution in Jiulong River estuary: Source, distribution and bacterial resistance. Chemosphere. 84:1677–1685.

