

Aislamiento, identificación y resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* aisladas de plantas de *Medicago sativa* regadas con agua convencional y depurada

M.T. TEJEDOR JUNCO*, M. GONZÁLEZ MARTÍN**, P. LUPIOLA GÓMEZ*, V. MENDOZA GRIMÓN*** y M.P. PALACIOS DÍAZ***.

* Microbiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado de Correos 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canarias, España. (E-mail: mtejedor@dcc.ulpgc.es; plupiola@dcc.ulpgc.es)

** Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado de Correos 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canarias, España. (E-mail: mgonzalez@dcc.ulpgc.es)

*** Agronomía. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado de Correos 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canaria, España. (E-mail: mpalacios@dpat.ulpgc.es; vanessa.mendoza@doctorandos.ulpgc.es)

RESUMEN

La existencia de reservorios ambientales del género *Enterococcus* ha sido propuesta por diversos autores. Diversas especies de *Enterococcus* pueden causar infecciones en el hombre y los animales y se han descrito numerosas cepas resistentes a los antibióticos que con mayor frecuencia se utilizan para el tratamiento. En este trabajo presentamos los resultados de aislamiento, identificación y sensibilidad a antimicrobianos de 78 cepas de *Enterococcus* obtenidas a partir de muestras de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) regadas con goteo enterrado utilizando dos calidades de agua: convencional (AC) y efluente secundario clorado de depuradora municipal (AD). La distribución global de especies fue: *E. faecalis* (10,2%), *E. faecium* (2,6%), *E. hirae* (5,1%), *E. casseliflavus* (2,6%) y *E. mundtii* (79,5%). Todas las cepas de *Enterococcus* aisladas eran sensibles a glicopéptidos, penicilina y ampicilina. No se detectaron cepas con alto nivel de resistencia a aminoglicósidos. No se observaron diferencias significativas en los valores de las CMI de los diferentes antibióticos entre muestras de diferentes orígenes. En general, se aislaban muy pocos “Enterococos fecales” a partir de tallos y hojas de alfalfa y la cantidad era independiente de la calidad de agua utilizada para el riego. Nuestros resultados indican que los riesgos sanitarios derivados del uso de agua depurada para el riego de cultivos parecen disminuir en gran medida cuando se utiliza riego enterrado por goteo.

Palabras clave: Alfalfa; antibióticos; *Enterococcus*; agua depurada.

INTRODUCCIÓN

Diferentes especies del género *Enterococcus* pueden aislarse con frecuencia a partir de muestras ambientales tales como suelo, aguas superficiales, plantas o productos animales sin procesar (Gagliardi *et al.*, 2003; McGowan *et al.*, 2006). Algunas

especies, por ejemplo *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. hirae* pertenecen a los denominados “Enterococos fecales” (Godfree *et al.*, 1997), que pueden causar enfermedades graves en el hombre y los animales y presentar resistencia a numerosos antibióticos. Diferentes autores sugieren que los enterococos ambientales podrían desempeñar un importante papel como

potenciales reservorios de cepas resistentes a antibióticos (Marcineck *et al.*, 1998; Dicuonzo *et al.*, 2001). Por otra parte, Witte (2000) propone que la utilización de agua sin depurar para regar cultivos podría causar la diseminación de determinantes genéticos de resistencia a bacterias ambientales, que a su vez podrían volver a transferir estos genes a bacterias de humanos y animales a través de los cultivos. Los riesgos sanitarios podrían disminuir utilizando un sistema de riego enterrado.

En este estudio presentamos los resultados de aislamiento, identificación y susceptibilidad a antibióticos de 78 cepas de *Enterococcus* aisladas a partir de plantas de alfalfa cultivadas utilizando un sistema de riego enterrado y dos calidades de agua: convencional (AC) y depurada procedente de un efluente secundario clorado de depuradora municipal (AD).

siguientes pruebas: tolerancia a bilis-esculina, crecimiento en NaCl 6,5%, tolerancia a telurito 0,04%, desaminación de arginina, movilidad, pigmentación, uso de piruvato, formación de ácido en metil α -D-glucopiranosido y diversas pruebas de fermentación de carbohidratos (1% manitol, sorbitol, sorbosa, arabinosa, sacarosa, rafinosa y lactosa).

Resistencia a antimicrobianos

Para detectar enterococos con alto nivel de resistencia a aminoglicósidos (HLAR) se realizó un cribado usando el método de dilución en agar. Se prepararon placas de Agar infusión de cerebro y corazón (Brain-Heart Infusion Agar, Difco) suplementadas con 500 μ g de gentamicina o 2000 μ g de estreptomomicina o kanamicina por ml.

La resistencia a glicopéptidos, aminoglicósidos, penicilina y ampicilina se determinó median-

TABLA 1. Distribución de especies de *Enterococcus* en función del origen de la muestra.

	<i>E. mundtii</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>
Origen 1	32 (86,5%)	2 (5,4%)	3 (8,1%)	0 (0%)	0 (0%)
Origen 2	21 (77,8%)	0 (0%)	1 (3,7%)	1 (3,7%)	4 (14,8%)
Origen 3	9 (64,3%)	0 (0%)	4 (28,6%)	1 (7,1%)	0 (0%)

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de plantas

Se tomaron muestras compuestas de plantas de alfalfa (tallos y hojas) en dos localizaciones: Plantas que crecían sobre las líneas de riego (origen 1: regadas con AC y origen 2: regadas con AD) y plantas que crecían en zonas situadas entre dos líneas de riego (origen 3: regadas con AD). Las muestras se tomaron cada dos meses a lo largo de un año.

Aislamiento e identificación de *Enterococcus*

Se pesaron 10 gr de cada muestra y se homogenizaron en Stomacher con 90 ml de Agua de Peptona (Difco Laboratories, Detroit, MI). Se dejaron 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se hicieron diluciones seriadas de 1/10 a 1/100 y 1/1000 en AP. Se añadió 1 ml de cada dilución a series de tres tubos con 9ml de Caldo Kanamicina-Esculina-azida (KAA, Difco) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Si se producía ennegrecimiento por hidrólisis de la esculina, se sembraba 0,1 ml en Agar m-Enterococos (mE Agar, Difco) y se incubaba a 37 °C durante 24h. Las colonias rojas observables como cocos Gram positivos en cadenas cortas tras la tinción de Gram, y que no poseían catalasa se consideraron "Enterococos fecales".

La identificación bioquímica se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Facklam *et al.* (1999) y añadiendo la prueba de metil- α -D-glucopiranosido (Chen *et al.*, 2000). Se realizaron las

te el cálculo de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) por el método de dilución en agar. Se calcularon los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀. Como cepa de control se empleó *E. faecalis* ATCC29212.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 78 cepas consideradas presuntamente como enterococos fecales. Tras la identificación bioquímica, la distribución global por especies fue: *E. faecalis* (10,2%), *E. faecium* (2,6%), *E. hirae* (5,1%), *E. casseliflavus* (2,6%) y *E. mundtii* (79,5%). La distribución de estas especies en relación con el origen de las muestras se presenta en la Tabla 1. La cantidad de "enterococos fecales" que se aislaba a partir de tallos y hojas de alfalfa era muy pequeña y no estaba relacionada con la calidad del agua utilizada para el riego. La especie de *Enterococcus* que aparecía con mayor frecuencia en todas las muestras era *E. mundtii*, una especie que generalmente no se incluye en el grupo de los "enterococos fecales". McGowan *et al.* (2006) encontraban que la especie predominante de *Enterococcus* aislada en vegetales era *Enterococcus casseliflavus* pero en su trabajo utilizaban riego superficial.

Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de las cepas de *Enterococcus* en función de sus orígenes se muestran en la Tabla 2. Todos los aislados de *Enterococcus* eran sensibles a glicopéptidos, penicilina y ampicilina. No se detectaron cepas con alto nivel de

TABLA 2. Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de cepas de *Enterococcus* de diferentes orígenes.

Antibiótico	(1)CMI ₅₀	(1)CMI ₉₀	(2)CMI ₅₀	(2)CMI ₉₀	(3)CMI ₅₀	(3)CMI ₉₀
Penicilina	0,5	2	0,5	2	1	2
Ampicilina	1	1	1	1	1	1
Vancomicina	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	1
Teicoplanina	0,125	0,25	0,125	0,25	0,125	0,25
Gentamicina	8	8	8	8	8	16
Estreptomina	32	64	32	64	64	64
Kanamicina	32	32	16	32	32	32

Plantas: (1) regadas con agua convencional (AC) y cultivadas sobre la línea de riego enterrado; (2) regadas con agua depurada (AD) y cultivadas sobre la línea de riego enterrado; (3) regadas con AD y cultivadas entre dos líneas de riego.

resistencia a aminoglicósidos. No se encontraron diferencias significativas en los valores de CMIs de los diferentes antibióticos en función del origen de la muestra. Martins da Costa *et al.* (2006) han descrito la presencia de cepas de *E. faecium* resistentes a ampicilina y vancomicina en aguas residuales, aunque el porcentaje de cepas resistentes en dicho estudio era pequeño (3,3% y 0,6% para ampicilina y vancomicina respectivamente).

Los riesgos sanitarios derivados del empleo de agua depurada para el riego de cultivos parecen disminuir cuando se utiliza un sistema de riego enterrado. El porcentaje de bacterias fecales en las plantas disminuye como era esperable y la proporción entre las distintas especies de *Enterococcus* difiere de la encontrada en muestras de agua depurada (Tejedor *et al.*, 2001). Los patrones de sensibilidad de los aislados de *Enterococcus* parecen ser independientes de la calidad de agua usada para el riego. Estos resultados deben considerarse con precaución ya que en estudios ecológicos, el aislamiento y caracterización de las subpoblaciones dominantes puede enmascarar otras subpoblaciones bacterianas importantes que pueden ser incluso más virulentas y tener mayor capacidad para colonizar hospedadores (McEwen y Fedorka-Cray, 2002).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Proyecto de Investigación CTM2005-07719-C02/TECNO del Ministerio de Educación y Ciencia (España).

BIBLIOGRAFÍA

Chen D.K., Pearce L., McGeer A., Low D.E. y Willey B.M. (2000). Evaluation of D-Xylose and 1% Methyl- α -D-Glucopyranoside fermentation test for distinguishing *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 3652-3655.

Dicuonzo, G., Gherardi, G., Lorino, G., Angeletti, S., Battistoni, F., Bertuccini, L., Creti, R., Di Rosa, R., Venditti, M. y Baldassarri, L. (2001). Antibiotic resistance and genomic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. *FEMS Microbiology Letters* **201**, 205-211.

Facklam R.R., Sham D.F. y Teixeira L.M. (1999). *Enterococcus*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Murray P.R., Baron E.J., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C. (eds). 7th edn., American Society for Microbiology. Washington D.C., U.S.A., pp 297-305.

Gagliardi J.V., Millner P.D., Lester G. y Ingram D. (2003). On-farm and postharvest processing sources of bacterial contamination to melon rinds. *Journal of Food Protection*, **66** (1), 82-7.

Godfree A.F., Kay D. y Wyer M.D. (1997). Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *Journal of Applied Microbiology*, Symposium (Suppl. **83**), 110S-119S.

Marcinek H., Wirth R., Muscholl-Silberhorn A. y Gauer M. (1998). *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 626-632.

Martins da Costa P., Vaz-Pires P. y Bernardo F. (2006). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, **40**, 1735-40.

McEwen S.A. y Fedorka-Cray P.J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*, **34** (Suppl. 3), S93-S106.

McGowan L.L., Jackson C.R., Barrett J.B., Hiott L.M. y Fedorka-Cray P.J. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *Journal of Food Protection*, **69** (12), 2976-82.

Tejedor Junco M.T., González Martín M., Pita Toledo M.L., Lupiola Gómez P. y Martín Barrasa J.L. (2001). Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **203**, 363-8.

Witte W. (2000). Ecological impact of antibiotic use
in animals on different complex microflora:

environment. *International Journal of
Antimicrobial Agents*, **14**, 321-5.