



**Efecto de efluentes de aguas residuales en el río
Guadarrama (Madrid) sobre el recuento y la cinética
de las comunidades bacterianas rizosféricas de dos
herbáceas pratenses riparias**

Autor: Pedro Jimenez Gómez

Institución: Universidad CEU San Pablo

Otros autores: Adrián Estévez Medina (Universidad CEU San Pablo); Pedro Jiménez Gómez (Universidad CEU San Pablo); Agustín Probanza Lobo (Universidad CEU San Pablo); Marina Robas Mora (Universidad CEU San Pablo)

Resumen

En el presente trabajo se estudia el efecto de la actividad antrópica (efluentes de aguas residuales) sobre comunidades bacterianas rizosféricas de herbáceas pratenses riparias que crecen en los márgenes inundables del río Guadarrama. Para ello, comparamos las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de dos especies de plantas de amplia distribución en el ecosistema, *Medicago polymorpha* y *Taraxacum dens-leonis*, crecidas en suelos sujetos inundación temporal con agua contaminada y otras con agua no contaminada.

Para ello, analizamos por una parte el metaresistoma, definido como el comportamiento de una comunidad microbiana frente a distintos antibióticos, y por otra el perfil metabólico (CLPP: Community Level Physiological Profile) de las comunidades bacterianas rizosféricas. El análisis del metaresistoma lo abordamos a través de tres aproximaciones: antibiograma por difusión en disco (de referencia), por galerías ATB® y por sistema Vitek®. El análisis de las comunidades bacterianas por CLPP lo realizamos empleando placas Biolog ECO®.

Nuestros resultados señalan una clara influencia antrópica en el desarrollo de resistencia a antibióticos de las comunidades bacterianas asociadas a rizosferas de plantas en suelos contaminados. Asimismo, encontramos indicadores que nos permiten averiguar la calidad del suelo pudiendo desplazar y modificar esas comunidades bacterianas rizosféricas.

Además hallamos que la contaminación afecta a dichas comunidades en otros aspectos, tales como una reducción en la diversidad y cinética metabólica de las comunidades bacterianas rizosféricas, con independencia de la planta considerada. Por último, el ACP (Análisis de Componentes Principales) realizado con los valores de CLPP muestra una discriminación entre las rizosferas de plantas en suelos limpios y contaminados, y en menor medida entre especie de plantas. En este ACP, los factores de carga de las comunidades rizobacterianas asociadas al suelo limpio o al suelo contaminado segregan las muestras resultando en un mayor consumo de ácidos orgánicos y aminoácidos por parte de las bacterias asociadas al suelo limpio, probablemente procedentes de exudados y un mayor consumo de azúcares por las bacterias de suelo contaminado, que relacionamos con los aportes de materia orgánica procedente de los efluentes.

Palabras clave: Comunidades bacterianas; Metaresistoma; Rizosfera, CLPP, Vitek®

1.- Introducción

1.1 Aspectos generales

La resistencia a antibióticos representa un problema global de salud, y requiere un mayor conocimiento de los genes responsables de dicha resistencia, su selección y su propagación por el entorno. Los antibióticos están siendo constantemente liberados al entorno, entre otras fuentes, a través de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Petrovic et al., 2003).

Se observa un incremento significativo de la abundancia relativa de genes de resistencia en muestras de biofilm recogidas río abajo de zonas de descarga de dichas plantas de tratamiento de aguas fecales. Aún así, dichos genes de resistencia también aparecen en muestras recogidas río arriba, sin intervención de la planta de tratamiento, lo que hace pensar en la existencia de genes de resistencia de forma natural. También se observan diferencias significativas con respecto a la estructura de la comunidad y su composición entre muestras de río, en zonas río debajo de la descarga y en zonas río arriba (Pruden et al., 2006, Pei et al., 2006, LaPara et al., 2011). Numerosos autores indican que la descarga de dichas plantas de tratamiento contribuye a la propagación de genes de resistencia antibiótica por el entorno y provoca un impacto en las comunidades bacterianas del río receptor.

Las bacterias, incluso en entornos naturales libres de antibióticos, pueden portar un amplio número de genes de resistencia (Allen et al., 2009). Es difícil explicar el papel de los antibióticos en ecosistemas naturales desde un punto de vista antropocéntrico, ya que se basa en aspectos clínicos, como la eficiencia de un antibiótico para curar una determinada infección o la resistencia de un patógeno a ser eliminado por dicha sustancia. Se ha estudiado que los antibióticos tienen otro papel en la naturaleza, se comportan como moléculas regulatorias o de señalización (Shiner et al., 2005) en ciertos procesos de la microbiota perteneciente a un determinado entorno natural, pero este papel se lleva a cabo a concentraciones subclínicas de dichas moléculas. Esta función de los antibióticos es poco conocida y necesita de estudios más amplios que ayuden a crear modelos para predecir posibles resistencias en nuevos antibióticos.

Las bacterias resistentes a antibióticos llegan a ecosistemas acuáticos por medio de personas y animales. Éstas bacterias pueden capturar genes de resistencia provenientes de bacterias portadoras (Alonso et al., 2001). Asimismo, muchos antibióticos de origen industrial circulan por el agua de desecho, pudiendo llegar a estos ecosistemas acuáticos y alterando de esta manera la microbiota original (Cabello, 2006). Dada esta problemática,

van apareciendo protocolos para el asesoramiento de riesgos con respecto a dichas bacterias y con respecto a los antibióticos. Se comienza a ver necesaria una política de contención y prevención de los posibles efectos de esta mezcla de bacterias, de origen animal y de origen humano, con las bacterias originarias de dicho ecosistema, con el fin de evitar la propagación de estos genes de resistencia antibiótica (Baquero et al., 2008).

Algunos recursos hídricos se han convertido en reservorios de genes resistentes a antibióticos que pueden, bajo ciertas condiciones ambientales, ser transferidos a patógenos en ambientes acuáticos, y eventualmente acantonarse en el suelo asociado a la raíz de las plantas. La opinión más generalizada en la comunidad científica acerca del rápido crecimiento y propagación de estas resistencias reside en el mal uso y abuso de antibióticos en la práctica clínica y agrícola.

Las raíces tienen diversas funciones para las plantas, de las que las más obvias son la adquisición de agua y nutrientes para el desarrollo de la planta, pero hay más otras más crípticas pero no menos importantes. La zona del suelo que rodea las raíces es una región dinámica ecológicamente, donde la planta interactúa con los organismos del suelo (principalmente bacterias y hongos), con la fracción órgano mineral del suelo y en la que ocurren numerosos procesos biogeoquímicos. Esta interfase suelo-raíz se conoce como rizosfera (Lynch, 1990). En ella, la planta libera sustancias (exudados) muy heterogéneos en su composición química y sustantivos en términos cuantitativos. Así, la rizosfera es un lugar deseable para la proliferación y acantonamiento de bacterias, que la planta regula mediante exudados. En la rizosfera, tienen lugar muchos procesos que afectan a la fisiología la planta y, a la vez, tienen una enorme influencia en la función y estructura de la comunidad bacteriana circundante.

En ese contexto, el estudio desde hace más de 30 años de los microorganismos rizosféricos, ha demostrado que las bacterias rizosféricas aportan soluciones integradas, que son mucho más que sus funciones individuales. El estudio de la diversidad genética y funcional de las bacterias rizosféricas ha permitido entender los mecanismos de acción de grupos de bacterias en relación a su entorno, libre o no, de antibióticos. Gracias a este conocimiento se observan cambios en la conciencia medioambiental o (por ejemplo) en prácticas agrícolas (Sofó et al., 2014).

1.2 Justificación

Conforme a lo anteriormente expuesto, es necesario profundizar sobre la resistencia a antibióticos como indicador de actividad antrópica (Martín Rocha, 2014). El concepto de metaresistoma es novedoso ya que, a diferencia del resistoma que hace referencia a una cepa bacteriana en concreto, este hace referencia a una comunidad bacteriana en general. Vinculado a este concepto se encuentra el análisis de la comunidad bacteriana, que aporta una visión de conjunto sobre la heterogeneidad de la comunidad.

1.3 Objetivo del trabajo

El objetivo del presente estudio ha sido analizar la influencia que puede ejercer el vertido de aguas residuales al río Guadarrama, asociados a procesos de encharcamiento temporal de los pastizales desarrollados en los márgenes del cauce fluvial sobre las comunidades bacterianas de dos especies pratenses riparias (*Medicago polymorpha* y *Taraxacum dens-leonis*) mediante el análisis del metaresistoma y la estructura metabólica (CLPP) de dichas comunidades bacterianas rizosféricas.

2. Materiales y Métodos

2.1. Recogida de muestras

Se seleccionaron dos localizaciones para el muestreo, en un mismo curso fluvial (río Guadarrama) pero en diferentes tramos del río:

- i) Curso alto: proximidades del **embalse de La Jarosa**, que se encuentra en el valle de La Jarosa, y pertenece al municipio madrileño de Guadarrama. En esta zona no existe aporte de aguas residuales y la calidad de las aguas es buena. En adelante identificamos las muestras de esta zona como **L** (Limpias).
- ii) Curso bajo: proximidades del **Castillo de Batres**, perteneciente al municipio de Villanueva de la Cañada, Madrid, donde encontramos un afluente del Guadarrama.
En esta zona hay vertidos de aguas residuales deficientemente depuradas, o no depuradas, al río. En adelante identificamos las muestras de esta zona como **C** (Contaminadas)

En cada localización de muestreo, se recogieron muestras de las dos especies de plantas estudiadas con su rizosfera. Las especies seleccionadas fueron dos de las presentes en praderas inundables de la margen del río Guadarrama, *Medicago polymorpha* (en adelante **A**) y *Taraxacum dens-leonis* (diente de león, en adelante **B**). Estas plantas son muy abundantes en los márgenes del río formando parte de comunidades pratenses inundables en crecida, y secas en estiaje.

Para la obtención de las plantas se siguió el procedimiento descrito en Ruiz-Palomino et al. (2005). Se extrajeron las plantas del suelo empleando un azada asepticada, retirando la planta completa con sus raíces y el suelo adherido a las mismas. Cada planta se introdujo en una bolsa de plástico nueva. Por cada planta se recogieron 15 ejemplares. La recogida de las muestras se realizó el día 4 de Marzo de 2014.

Todas las muestras fueron recogidas en bolsas de plástico nuevas y se guardaron en nevera (4°C) hasta que se procesaron.

2.2. Obtención del suelo rizosférico.

Una vez en el laboratorio, se procedió como sigue para la obtención de muestras de suelo rizosférico: la raíz de cada ejemplar de planta se agito suavemente con objeto de eliminar fracciones de suelo que no estuviesen íntimamente pegadas a la raíz. Seguidamente, se separó cuidadosamente la parte del suelo adherido a la raíz hasta completar 2 g por planta. Por cada zona se reunió y homogenizó el suelo rizosférico de 5 ejemplares para constituir una réplica, por lo que el total de réplicas fue de 3 por zona de muestreo.

2.3. Extracción de las comunidades bacterianas rizosféricas y del suelo libre.

Para esta actividad se siguió el procedimiento descrito en García-Villaraco et al. (2010) modificado. Para ello, 2 g de suelo se suspendieron en 20 ml de solución salina (NaCl 0,45%) estéril y se procedió a su homogenización a 16.000 r.p.m. durante 2 minutos. Seguidamente, se centrifugo a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos. Obtenemos la dilución 10^{-1} para el siguiente paso.

2.4. Recuento semicuantitativo de bacterias.

Después de extraer las bacterias de las diferentes muestras (A y B) de las dos localizaciones (C y L), como se ha indicado en 2.3., se procedió a realizar un recuento semicuantitativo en laminocultivo. Para ello, se sembró directamente a partir de la dilución 10^{-1} en los tubos Uritest® (1 tubo por cada replica) y se incubaron a 37°C para su posterior recuento.

2.5. Análisis del metaresistoma.

2.5.1. Metaresistoma de muestras de rizosfera.

Para la obtención del metaresistoma fue necesaria la adecuación de técnicas tradicionalmente empleadas para el resistoma de las bacterias. Para ello recurrimos a las técnicas de difusión en disco, ATB® y Vitek®. Proponemos, en el presente estudio, los siguientes métodos adaptados según la metodología descrita por Martin Rocha (2014):

- **Técnica de difusión de disco:** Se sembró por inmersión en agar Mueller-Hinton. Se añadieron discos de los siguientes antibióticos: Amoxicilina, Amoxicilina/Clavulánico, Imipenem, Gentamicina, Ciprofloxacino, Cefuroxima, Piperacilina, Ac Nalidíxico, Tobramicina, Amikacina, Cotrimoxazol y Tetraciclina. Se incubaron a 37° durante 24 horas y se midió el halo de inhibición.

- **ATB® modificado:** Se añadieron 100µl de la dilución 10^{-1} a 7ml de ATB medium®. Tras homogeneizar, se tomaron 135µl y se añadieron a cada pocillo de la galería, y se incubaron durante 24h a 37°C. Finalmente se procedió a la lectura de la densidad óptica.
- **Vitek® modificado:** Se añadieron 3ml de la dilución 10^{-1} ajustando a 0,5 McFarland, y se procedió a su lectura.

2.5.2. Metaresistoma de muestras de poblaciones bacterianas mesófilasaerobias totales.

Se empleó como método el descrito por el fabricante para Vitek® modificado. Se procedió a sembrar en agar sangre un volumen de 0'1ml de la dilución de 10^{-1} de la comunidad rizosférica conforme al punto 2.3 del presente documento. Se incubó a 37°C durante 48h. A partir del crecimiento en la placa se procedió a homogeneizar las colonias en solución salina 0,45% NaCl. A continuación se tomó una alícuota que añadimos a 3ml de solución salina 0,45% NaCl hasta alcanzar la concentración de 0,5 McFarland. Conforme a las indicaciones del fabricante se tomó un inóculo de 165µl sobre 3ml de NaCl 0,45%. Con dicho volumen se procedió a la inoculación, incubación y lectura de las tarjetas de Vitek®

2.6. Perfiles metabólicos de las comunidades bacterianas.

El estudio del perfil metabólico (CLPP) se realizó mediante Biolog ECO®. Las placas empleados en este estudio (Biolog EcoPlates ® Biolog, Inc., Hayward, CA, USA) constan de 96 pocillos que contienen diferentes fuentes de carbono y nitrógeno liofilizadas así como un indicador redox del consumo de dicha fuente (sales de Tetrazolio).

Estas, viran a violeta en medio reductor (mas color cuanto más sustrato se produzca). Cada placa consta de tres bloques repetidos de 31 sustratos (y un pocillo blanco) que actúan como repeticiones para las medidas. Los detalles técnicos se pueden consultar en:http://www.biolog.com/pdf/milit/00A_012_EcoPlate_Sell_Sheet.pdf

A partir de la suspensión microbiana obtenida (y descrita) en la actividad 2.3 se cargaron los pocillos de las placas Biolog ECO con 135 µl en cada uno mediante pipeta multicanal. Esto se realizó para cada uno de los dos suelos estudiados (C y L) y para cada especie de planta (A y B). Las placas se incubaron a 27°C y se midió la absorbancia a 590nm, a las 22, 39, 47, 61, 72, 87, 109 y 133 horas de incubación.

Con los datos obtenidos de absorbancia para cada tratamiento y tiempo de medida, se corrigió cada valor restándole el blanco (absorbancia corregida). Seguidamente se calculó la media de absorbancia corregida de todos los pocillos como la media de los 31 valores de absorbancia corregidos para cada replica.

Seguidamente, se representó el valor de AWCD (Average Well Color Development) frente al tiempo de incubación, para obtener las curvas de crecimiento de la comunidad microbiana en los pocillos de la placa (**cinética de comunidades**). En estas curvas se eligió el momento de incubación en el que el crecimiento de los microorganismos estaba iniciando la fase estacionaria.

Con los valores de absorbancia corregidos del momento de incubación escogido se calculó la **diversidad metabólica** de cada muestra utilizando el índice de diversidad de Shannon-Weaver.

$$H(m) = -\sum q_i \log_2 q_i$$

Siendo $q_i = n/N$, donde n es la absorbancia corregida (AWDC) a 590 nm de cada pocillo de Biolog ECO, y N la absorbancia total, es decir de todos los pocillos.

2.7. Tratamiento de los datos.

El análisis de los datos pre procesados se hizo mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa estadístico SPSS v.19.0 (SSPS Inc.). Se realizaron estos análisis multivariantes tanto para evaluar las similitudes entre tratamientos (CA, CB, LA y LB) como para discriminar los factores de carga de esa ordenación (fuentes de carbono de la placa Biolog Eco).

Así mismo se realizaron ANOVAs unidireccionales con los resultados de la cinética de las comunidades (comparándose tratamientos para cada tiempo de medida, en los distintos tratamientos) y para los valores de diversidad metabólica (en cada tratamiento). Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) se realizó el test de Duncan. Para todo ello se empleó el programa estadístico referido en el párrafo anterior.

3. Resultados y Discusión.

3.1. Recuento semicuantitativo de Bacterias.

La **figura 1** muestra los resultados del recuento semicuantitativo, de la comunidades bacterianas de cada una de las muestras (en unidades formadoras de colonias, ufc). Como se puede observar, LB es la muestra que presenta el valor más bajo, siendo LA la que muestra un valor más alto, quedando CA y CB entre las dos primeras.

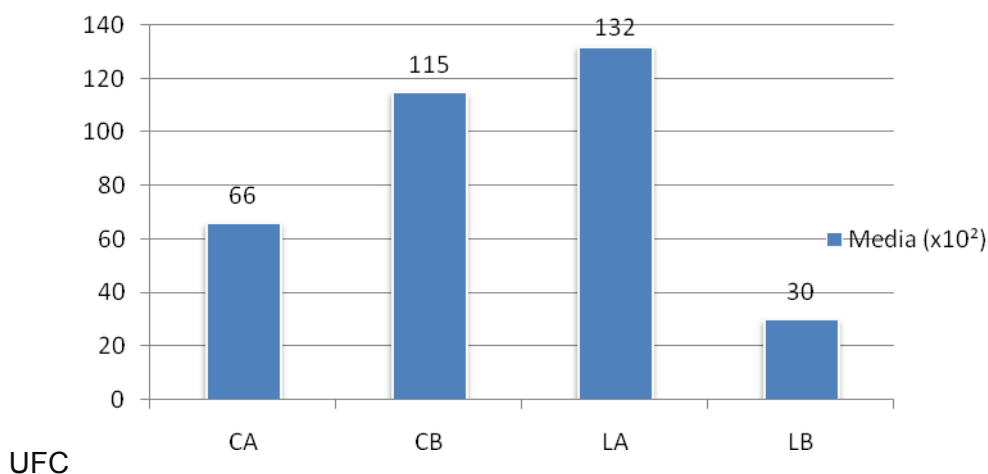


Figura 1: Representación gráfica de la media de los recuentos bacterianos (unidades formadoras de colonias, ufc) de las tres replicas por muestra, de las poblaciones rizosféricas de las plantas “A” y “B” en los suelos “C” y “L”.

Las poblaciones microbianas pueden sufrir variaciones en su número en cortos periodos de tiempo, bien por las condiciones bióticas o abióticas del entorno, o por variaciones intrínsecas del medio que habitan, entre otros.

Analizamos el número de bacterias en los diferentes suelos para ver si son comparables, con el fin de evitar sesgos debido a variaciones importantes en cantidad total de bacterias. De éste modo podemos ver que las comunidades de microorganismos son comparables para valorar el metaresistema. De otro modo, si existiese un mayor número en dichas poblaciones podría derivar en falsos positivos de resistencia antibiótica, interpretándose erróneamente como un aumento de resistencia como efecto de la actividad antrópica.

Las cuatro muestras comparten el mismo orden de magnitud (10²), por lo que consideramos que no existen diferencias en el recuento de bacterias. Es destacable el bajo número de bacterias detectado, muy inferior al habitual en el entorno rizosférico. Probablemente esto se relaciona con la temperatura de cultivo, superior al óptimo de

dichas comunidades. No obstante se emplea esta temperatura para normalizar las condiciones.

3.2. Comparativa de los métodos para la obtención del metaresistoma.

Utilizando los criterios EUCAST 2013, tomaremos como referencia los resultados de difusión en disco, comparando las técnicas automáticas y semiautomáticas con respecto a la técnica de difusión en disco. La tabla I resume los resultados de tres replicas por muestra. En caso de divergencia en los resultados de las réplicas de una muestra daremos como resultado final el mayoritario. Así como las técnicas automáticas y semiautomáticas pueden mostrar falsos positivos por crecimientos puntuales de hongos en áreas de lectura de los pocillos, esto no sucede en la valoración de la difusión en disco, ya que en esta técnica detectaremos el crecimiento microbiano y evaluamos el diámetro en milímetros del halo de inhibición.

En la **tabla I** se muestran resultados de comparación de muestras con los mismos orígenes frente a diferentes métodos modificados. Como limitación de las técnicas semiautomáticas (ATB®) podemos encontrar algunos resultados que por su singularidad podrían ser falsos positivos, como con tobramicina en CA y LA, e imipenem en LA (crecimiento de hongos, etc.).

	CA			CB			LA			LB		
	Disco	ATB	Vitek	Disco	ATB	Vitek	Disco	ATB	Vitek	Disco	ATB	Vitek
AMP	R	R	-	R	R	-	R	R	-	R	R	-
IMI	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
PIC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AUG	R	R	-	R	S	-	R	S	-	R	R	-
GEN	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S
AK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TOB	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
CTX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TSU	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
NA	R	R	-	R	R	-	S	S	-	S	S	-
CIP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE	R	S	-	R	R	-	I	R	-	S	S	-

Tabla I: Metaresistoma de las distintas muestras y técnicas. Resistente (R, sombreado rosa), sensible (S, sombreado verde) o intermedio (I, sombreado amarillo); el guión (-) indica que el antibiótico no está disponible para ese método. Los antibióticos: ampicilina (AMP), imipenem (IMI), piperacilina (PIC), amoxicilina-clavulánico (AUG), gentamicina (GEN), amicacina (AK), tobramicina (TOB), cefotaxima (CTX), trimetoprim-sulfometoxazol (TSU), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacino (CIP) y tetraciclina (TE). Conforme criterios EUCAST (2013).

A partir de los resultados reflejados en la tabla I pasaremos a interpretarlos y valorar la coherencia entre ellos, especialmente en la comparativa de métodos automáticos y semiautomáticos con respecto a la técnica de difusión en disco.

Para considerar interpretable la tabla, el primer elemento a valorar es la coherencia de cada uno de los metaresistomas. Aun existiendo diferentes resultados en los distintos metaresistomas con plantas y suelo de orígenes distintos, cada uno de ellos si resulta fenotípicamente explicable. Si analizamos los beta-lactámicos, encontramos en todos los casos que las resistencias a imipenem (carbapenema) y a piperacilina (antipseudomónico), no podrían darse de forma concomitante con un resultado de sensibilidad a ampicilina o a amoxicilina-clavulánico. Éste es el motivo por el que verificamos que la resistencia a imipenem en suelo limpio, planta A, para la técnica ATB® como falso positivo, ya que encontramos un crecimiento anómalo en el pocillo. Siguiendo el mismo criterio de coherencia en la valoración de las distintas familias de antibióticos encontramos que una vez localizados los falsos positivos los resultados del metaresistoma son comparables entre sí.

Calcularemos el índice de homología (%) de los otros dos métodos, con respecto al disco (**tabla II**). Para ello comparo el número total de resistencias o sensibilidades del método de difusión en disco con respecto a la técnica ATB® (sobre 12 antibióticos, los mismos que con el disco) y con respecto a Vitek® (sobre 8 antibióticos, pues son los que coinciden en ambos métodos).

CA		CB		LA		LB	
ATB	Vitek	ATB	Vitek	ATB	Vitek	ATB	Vitek
75%	100%	91.6%	100%	66.6%	100%	91.6%	87.5%

Tabla II: índice de homología de los métodos ATB® y Vitek® con respecto al disco, en cada suelo (C y L) y en cada planta (A y B).

En la tabla II podemos observar que el Vitek® tiene una homología del 100% con el método de difusión en disco (método de referencia). Esto se reproduce en todos los casos salvo en LB, en el que el ATB® tiene un índice de homología superior. Esto se debe a que en ambos casos sólo difieren en un resultado contra el método de referencia, pero para la técnica de ATB® consideramos 12 indicadores frente a los 8 que consideramos para Vitek®. De este modo la ponderación que este mismo valor no coincidente “pesa” en la comparativa de los métodos presenta un valor más alto en Vitek®. No obstante, no supone en realidad una diferencia notable entre la homología que presenta la técnica Vitek® con la que presenta ATB® para la valoración del metaresistoma en este suelo. Por los resultados anteriores consideramos que el índice de

homología de Vitek® contra disco es sustancialmente superior, alcanzando en la mayoría de las muestras un índice del 100%.

En adelante y por este motivo utilizaremos la técnica de Vitek® para la obtención del metaresistoma, bajo el criterio EUCAST para gram-negativos, ya que numerosos estudios evidencian que éstos son los microorganismos más abundantes (Sylvia et al., 1999).

Del mismo modo que ya se ha descrito, debemos verificar la posible valoración como falso positivo cuando encontramos turbidez anómala en los pocillos de galerías de métodos automáticos y semiautomáticos. Estos métodos también pueden suponer una ventaja en la valoración de los metaresistomas de comunidades complejas. Esta ventaja se evidencia en los casos en los que al tratar de medir los diámetros en la técnica de difusión en disco, encontramos que no aparecen halos definidos (**figura 2**), sino una dispersión de colonia de respuesta heterogénea frente a un antibiótico.

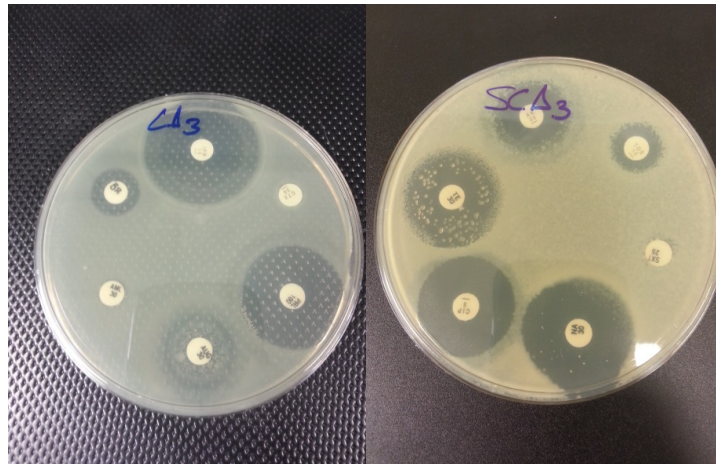


Imagen A: halo bien definido Imagen B: halo mal definido.

Figura 2: fotografías mostrando la nitidez de halos de inhibición en dos ejemplos de la técnica de difusión en disco.

En los casos que valoramos la respuesta de la comunidad frente a un antibiótico, tal como la imagen b de la figura 2, no existe un criterio objetivo para tomar una medición de halo definida, por lo que la técnica de difusión en disco no sería válida. Para este tipo de casos resultan muy útiles los métodos basados en la densidad microbiana (turbidimetría), como lo son las técnicas automáticas (Vitek®).

3.3. Análisis del Metaresistoma

3.3.1. Metaresistoma de comunidad

Para la valoración y discusión de resultados en este apartado, consideraremos que la comunidad queda constituida mayoritariamente por bacterias gram-negativas, tal como muestran estudios previos de otros autores (Sylvia et al., 1999). El efecto de resistencia

en las distintas poblaciones puede deberse al efecto aditivo o sinérgico de las diferentes cepas de las mismas familias.

	CA	CB	LA	LB
PIP	R	R	S	R
TZP	I	S	S	I
CTX	R	R	S	R
CAZ	R	R	S	S
FEP	R	S	S	S
ATM	R	R	S	S
IMI	S	S	S	R
MRP	S	S	S	S
AK	S	S	S	S
GEN	S	S	S	S
TOB	S	S	S	S
CIP	S	S	S	S
MOX	S	S	S	S
TGC	S	S	S	S
FOS	R	R	R	R
COL	R	R	S	S
TSU	S	S	S	S

Tabla III: Metaresistoma de la comunidad obtenido por Vitek® para las muestras de suelo limpio (L) y contaminado (C); para los dos tipos de plantas, A y B. Resistente (R, sombreado rosa), sensible (S, sombreado verde). Antibióticos: piperacilina (PIP), piperacilina-tazobactam (TZP), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IMI), meropenem (MRP), ampicilina (AK), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), ciprofloxacino (CIP), moxifloxacino (MOX), tigeciclina (TGC), fosfomicina (FOS), colistina (COL), trimetoprima-sulfametoxazol (TSU). Conforme criterios EUCAST 2013.

Conforme a la propia definición de metaresistoma, las resistencias que muestran las comunidades pueden deberse al efecto de la interacción entre las distintas cepas constituyentes (aditivo, sinérgico o antagónico), mediado por procesos de comunicación microbiana y de respuesta frente a factores abióticos.

A partir de los resultados obtenidos enfrentando el grupo de beta-lactámicos observamos la aparición de resistencias tanto en suelo sucio como en suelo limpio. Dado que las betalactamasas son el principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos, nuestros resultados podrían también a nivel global, dar respuestas a los diferentes metaresistomas. Habida cuenta de que en entornos naturales las bacterias pueden tomar contacto a menudo con penicilinas, la resistencia detectada en los metaresistomas a ampicilina podría producirse sin intervención del hombre. Del mismo modo, la presencia notable de *Pseudomonas* y algunos *Bacillus* en el suelo podrían ser la explicación de la

resistencia a amoxicilina-clavulánico, para el que las *Pseudomonas* presentan una resistencia natural. Continuando con este razonamiento, también resultan coherentes los valores de sensibilidad más altos para piperacilina. De forma comparada, en suelo limpio bajo la acción de la planta A, encontramos un nivel de sensibilidad cuando testamos para los beta-lactámicos. Esto nos indica que en dicha comunidad debemos encontrar abundancia de otras bacterias gram-negativas (enterobacterias). Estas poblaciones deben estar presentes en todos los suelos, ya que aun pudiendo colaborar con niveles de resistencia a amoxicilina-clavulánico, todos los metaresistomas de las distintas muestras presentan sensibilidad a carbapenemas (imipenem).

Debemos destacar que en todos los grupos de antibióticos beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas...) el nivel de resistencia es ostensiblemente mayor en muestras de suelo sucio, lo que nos evidencia un marcado efecto antrópico, en tanto que la contaminación a la que están sometidas estas muestras es de origen biológico. Este efecto se encuentra moderadamente apantallado en la filosfera de la planta B, pero es muy evidente en la planta A. Estos mismos resultados los encontramos paralelamente en el caso de la colistina, en la que se observan resistencias sólo en muestras de suelo contaminado

Comparando la piperacilina con piperacilina-tazobactam observamos la aparición de resistencias en el caso de la primera, lo que es lógico debido a la presencia de beta-lactamasas en el medio natural, por ello no podemos afirmar que se deba al efecto antrópico. En el caso de piperacilina con su inhibidor de beta-lactamasas, tazobactam, observamos que dos de esas resistencias tornan a intermedias, puede ser una anomalía natural, podría responder a una huella de efecto antrópico. No podemos afirmarlo ya que no existen estudios para compararlo.

En el caso de las cefalosporinas se observan diferencias significativas entre ambos suelos, tenemos cinco resistencias en suelo contaminado y cinco sensibilidades en suelo limpio, en este caso sí que podríamos apuntar al efecto antrópico ya que estos niveles de resistencias a cefalosporinas no se encuentran en suelos no contaminados. De este modo, analizando los resultados del grupo de las quinolonas y ya que son de síntesis artificial, una aparición de resistencia en esta familia se debería exclusivamente a la acción humana. Aunque relacionado, no es exactamente la misma explicación que en el caso de los beta-lactámicos, dado que las betalactamasas pueden ser las responsables de dichas resistencias, si bien estas si se encuentran en la naturaleza sin la exclusiva intervención selectiva del hombre, lo que hace de su presencia un indicador de presión antrópica cuyos resultados pueden revertir si la presión antrópica desaparece.

La modificación del metaresistoma de quinolonas es uno de los mejores indicadores de acción antrópica, para ello nos conviene observar una quinolona de primera generación, como el ácido nalidíxico, que no se encuentra en esta tabla pero sí en la tabla II. En ella se pone de manifiesto dicha actividad antrópica, resistencias en suelo contaminado y

sensibilidad en suelo limpio. Podría ser que el efecto de apantallamiento tenga una notable importancia en la población.

3.3.2. Metaresistoma de mesófilos aerobios totales.

Como se describió anteriormente, analizamos el metaresistoma de mesófilos aerobios totales para valorar el peso de las poblaciones bacterianas con alta tasa de crecimiento, los cuales reflejamos en la tabla IV.

A partir de los resultados obtenidos en el metaresistoma de mesófilos aerobios, para el grupo de beta-lactámicos observamos la aparición de resistencias tanto en suelo sucio como en suelo limpio. Los valores de sensibilidad para piperacilina son coherentes, siendo sensiblemente más altos. Observamos un nivel de sensibilidad para el suelo limpio de la planta A, lo cual nos podría indicar que en dicha comunidad debemos encontrar abundancia de otras bacterias gram-negativas. Estas poblaciones están presentes en todos los suelos de nuestro estudio. En este sentido observamos que los metaresistomas de las distintas muestras presentan sensibilidad a imipenem.

Cabe destacar que en el grupo de las cefalosporinas, el nivel de resistencia en suelo limpio aumenta en comparación con la tabla III, esto puede deberse a que para la elaboración del metaresistoma de mesófilos aerobios totales hemos seleccionado cepas que pueden crecer más rápidamente, y por ello, elevar el nivel de resistencia en suelo limpio, especialmente en el caso de la planta B. Estos resultados se observan paralelamente en el caso de la colistina, con una aparición de resistencias en ambos suelos, para ambas plantas.

	CA	CB	LA	LB
PIP	R	R	S	R
TZP	S	S	S	S
CTX	R	R	S	R
CAZ	R	R	R	R
FEP	R	R	S	R
ATM	R	R	R	R
IMI	S	S	S	S
MRP	I	S	S	R
AK	S	S	S	S
GEN	S	S	S	S
TOB	S	S	S	S
CIP	S	S	S	S
MOX	S	S	S	S
TGC	S	S	S	S
FOS	S	S	R	R
COL	R	R	R	R
TSU	S	S	S	S

Tabla IV: metaresistoma de los mesófilos aerobios totales elaborado por medio de Vitek® para las muestras de suelo limpio (L) y contaminado (C); para los dos tipos de plantas, A y B. Resistente (R, sombreado rosa), sensible (S, sombreado verde) o intermedio (I, sombreado amarillo). Antibióticos: piperacilina (PIP), piperacilina-tazobactam (TZP), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IMI), meropenem (MRP), ampicilina (AK), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), ciprofloxacino (CIP), moxifloxacino (MOX), tigeciclina (TGC), fosfomicina (FOS), colistina (COL), trimetoprima-sulfametoxazol (TSU). Conforme criterios EUCAST (2013).

La aparición puntual de resistencia a meropenem en suelo limpio para la planta B, así como el resultado intermedio para CA, podría deberse a un artefacto en la prueba, dado que los resultados deberían ser homólogos al imipenem, o en cualquier caso más sensibles. Por ello no entraremos a valorar éste resultado

No observamos cambios en las quinolonas, que hemos descrito como un posible indicador de actividad antrópica. El resultado de la fosfomicina es el único incongruente, aparecen los papeles cambiados, resistencia en suelo limpio y sensible en suelo contaminado.

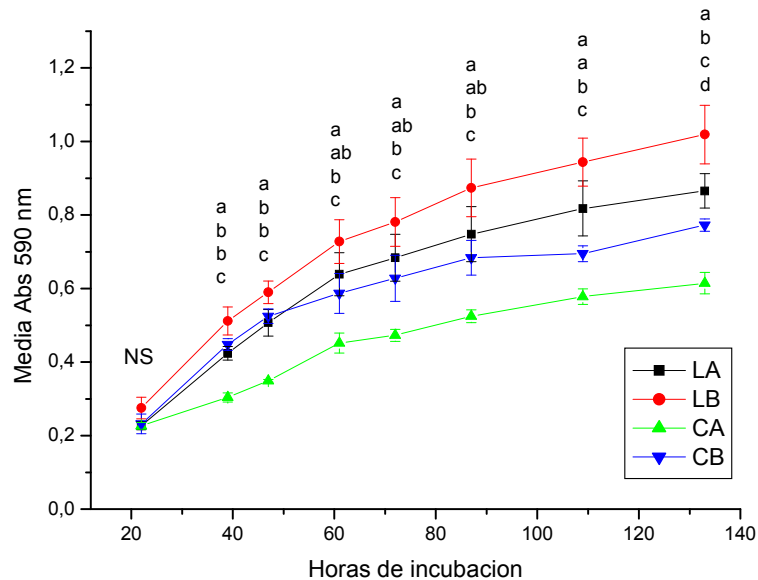
Se trata de un metaresistoma muy parecido al de la comunidad, dado que hemos seleccionado las mismas poblaciones.

3.4. Perfiles metabólicos de las comunidades bacterianas.

3.4.1. Cinéticas de las comunidades bacterianas.

En la **figura 3** se representa el valor de AWCD obtenido en las placas de Biolog Eco, frente al tiempo de incubación de cada muestra. Esta representación gráfica nos da idea de la dinámica temporal de las comunidades bacterianas sometidas a los diferentes

manejos al crecer en placa, y de su funcionalidad



metabólica.

Figura 3. Valor de AWCD obtenido en las placas Biolog Eco, frente al tiempo de incubación de cada uno de las muestras estudiadas. En ordenadas se representa la absorbancia promedio de las tres repeticiones de cada réplica (n=3) y las barras de error estándar. Las letras a, b y c indican diferencias entre los manejos ($p < 0.05$), para cada tiempo de medición. NS, no hay diferencias significativas.

Como se puede observar, en el primer punto de la gráfica (20h de incubación) no existen diferencias significativas entre las distintas muestras. A partir de ahí se produce un aumento de absorbancia en todas las muestras, resultando una mayor pendiente en mayor actividad bacteriana y viceversa. En general las muestras de suelo limpio (L) presentan mayor actividad que las de suelo contaminado (C), y la actividad de las comunidades bacterianas rizosféricas de la planta B es significativamente mayor que la A en las medidas de mayor AWCD. La mayor actividad en suelo limpio puede deberse a que la contaminación limite la funcionalidad de las comunidades bacterianas invadidas por otras que dado su perfil metabólico “solapen” a las primeras.

3.4.2. Diversidad metabólica.

En la **figura 4** se muestran los valores de diversidad metabólica encontrados en cada muestra estudiada.

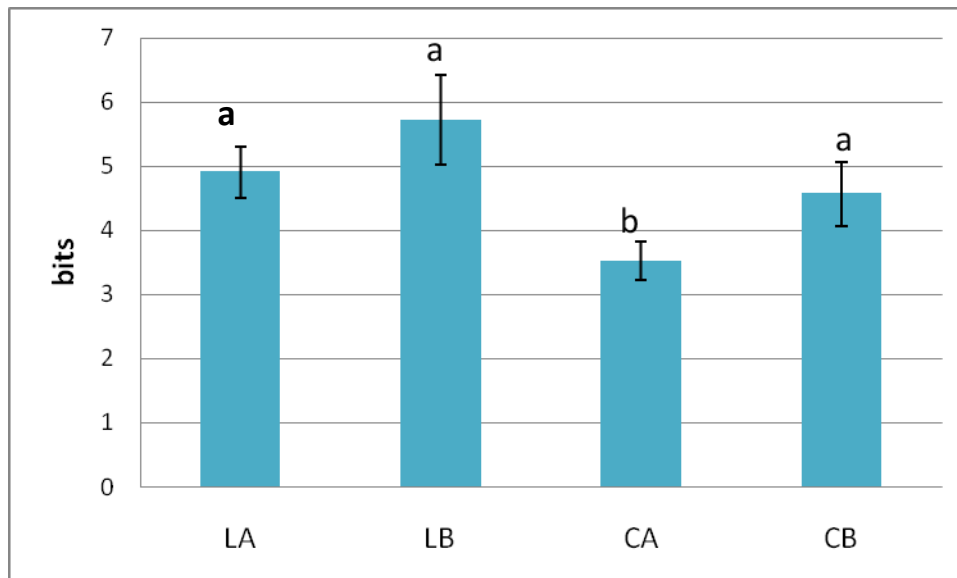


Figura 4. Valores de la diversidad metabólica [H(m)] obtenido a partir de los valores de absorbancia a 94 horas en las placas Biolog Eco, promedio de las tres repeticiones de cada réplica (n=3) y las barras de error estándar. Las letras a y b indican diferencias entre los manejos ($p < 0.05$).

No se detectan diferencias significativas entre las distintas muestras, a excepción de CA respecto a las demás, que presenta la menor diversidad, lo que es coherente con los resultados de cinética. Que la actividad de CA sea menor puede indicar una comunidad más simplificada, ya que la contaminación puede desplazar la comunidad bacteriana original, siendo sustituida por una comunidad alóctona.

En las situaciones de invasión de hábitat es habitual que la especie (o especies) invasora (s) deprima la diversidad. En lo relativo a *especies invasoras* de la rizosfera por efecto de contacto con aguas residuales, no abunda en la literatura referencias previas. Cook et al. (2006) sí refieren en un estudio sobre riqueza, estabilidad y función en rizosfera de las plantas para el tratamiento de aguas residuales una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, la 5RL, como especie invasora de la rizosfera, desplazando la microbiota autóctona y deprimiendo la diversidad de la misma. Este efecto invasivo por *Pseudomonases* consistente con la capacidad colonizadora de la citada bacteria de la rizosfera (de Weger et al., 1991).

3.4.3. Diferencias en el CLPP de las comunidades (ACP).

Con los resultados globales para todas las repeticiones, réplicas y con las fuentes de carbono de Biolog ECO® para cada una de las muestras se realizó un ACP. Los dos primeros componentes absorben un 79,1% de la varianza, explicando el primero un 51,7% y el segundo un 27,4%.

En la figura 5, el ACP (Análisis de Componentes Principales) indica que la contaminación hace efecto, las muestras de suelo limpio están gráficamente próximas entre sí (menor distancia euclídea), y las muestras de suelo contaminado también se encuentran cerca entre sí. Existe una discriminación clara entre ambos tipos de suelo.

No observamos diferencias entre la planta A y la B en suelo limpio, a pesar de ser plantas distintas, el perfil metabólico de la comunidad bacteriana es similar (plantas recogidas en la misma época del año, condiciones hídricas similares, etc.). Esto es llamativo, habida cuenta que la bibliografía indica que hay una clara diferencia en la estructura taxonómica y funcional de las comunidades rizosféricas de especies diferentes (Söderberg et al., 2004). En cambio, en suelo contaminado sí se observan diferencias entre el CLPP de la rizosfera de ambas plantas, siendo mas acusada esta diferencia en la planta A, algo coherente con los resultados de diversidad metabólica y cinética, donde observamos que CA es significativamente distinto a los demás, resultando en una actividad más baja de éste comparado a las otras tres muestras.

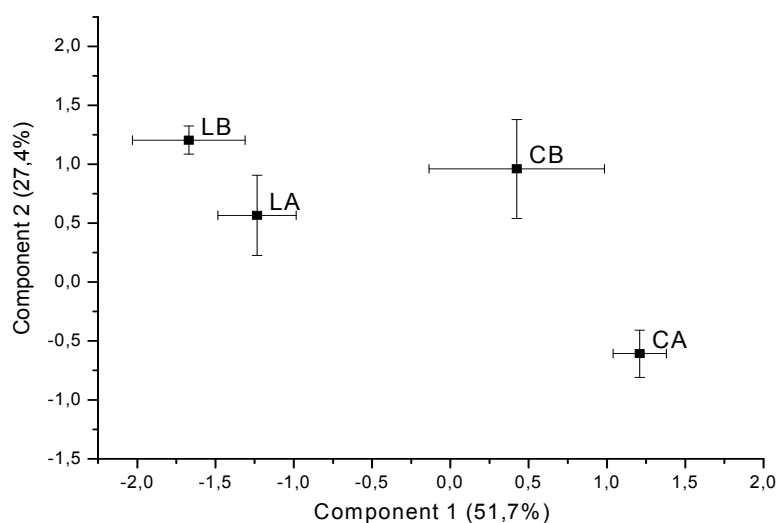


Figura 5. Representación del ACP de las muestras de Biolog Eco (CLPP en las diferentes muestras) proyectados en los dos primeros componentes; n=3, y barras de error estándar.

La **figura 6** muestra los factores de carga del ACP representado en la figura 5. Consideramos conjuntamente la localización en el plano de las muestras (figura 5) y de los factores de carga (figura 6), se observa que en las muestras de suelo limpio (L) los factores de carga predominantes son ácidos orgánicos y aminoácidos, mientras que en los suelos contaminados (C) son fundamentalmente azúcares.

El mayor o menor consumo de determinadas fuentes de carbono en las placas de Biolog ECO nos habla de un menor o mayor consumo de estas fuentes en la rizosfera por parte

de las bacterias antes de ser extraídas. Por ello podemos especular que los exudados de las plantas no perturbadas son especialmente ricos en ácidos orgánicos y aminoácidos. Son numerosos los autores que han encontrado este tipo de moléculas en exudados radicales (Harsh et al., 2006).

Siguiendo el razonamiento anterior, podríamos pensar que los exudados de plantas en suelo perturbado podrían ser ricos en azúcares (principal factor de carga en ACP), sin embargo la cantidad de estos componentes que las plantas liberan por exudación está muy restringida (Harsh et al., 2006). Una explicación alternativa estaría en que los efluentes sean ricos en azúcares sencillos, tal vez procedentes de la degradación de materia orgánica que acompaña las aguas residuales, y que las comunidades rizosfericas se hayan adaptado a este aporte carbonado de aluvión.

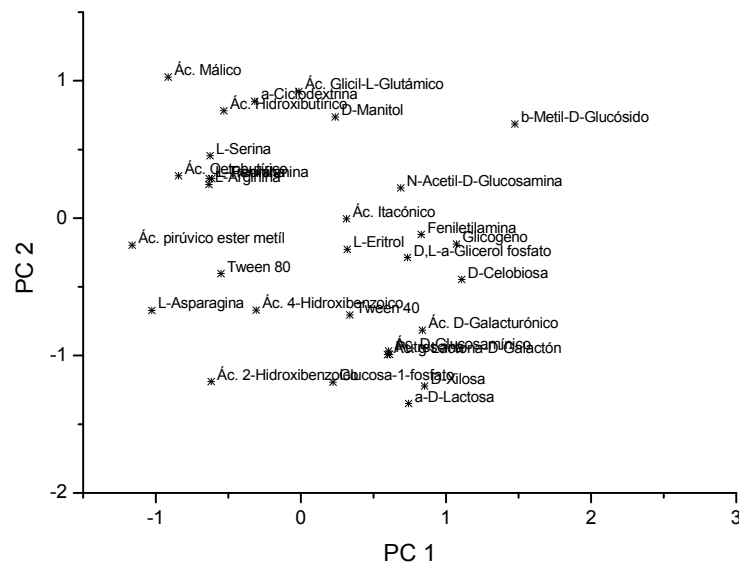


Figura 6. Representación de los factores de carga del ACP de las muestras de Biolog Eco® (CLPP en las diferentes muestras).

En síntesis, el análisis realizado indica que los perfiles metabólicos de las comunidades bacterianas rizosfericas de *Medicago Polimorpha* y *Taraxacum dens-leonis* se ven afectados tanto en su cinética, diversidad metabólica y estructura funcional por el encharcamiento temporal con efluentes contaminados. Efectos semejantes fueron detectados (también utilizando Biolog ECO®, entre otros métodos) por Gelsomino et al. (2006). Estos autores estudian un suelo agrícola recurrentemente inundado por aguas residuales y, como en nuestro caso, encuentran diferencias con respecto a suelos no contaminados. Hay que matizar sin embargo, en esta comparación, que en nuestro caso estudiamos suelos rizosféricos, y Gelsomino et al. (2006) estudian suelo libre, donde sin duda el impacto es mayor que en la rizosfera.

4. Conclusiones

1. Una vez realizadas tres aproximaciones para analizar la resistencia de diferentes comunidades bacterianas a antibióticos esto es, el metaresistoma, encontramos que el empleo de tarjetas Vitek® proporciona una herramienta de utilidad para comparar comunidades bacterianas.
2. De los resultados obtenidos del metaresistoma de las comunidades frente a quinolonas de primera generación, se desprende que la aparición de resistencias en suelo contaminado es sensiblemente superior que en suelo limpio. Este hecho puede encontrar su explicación en que dicha contaminación es de origen biológico.
3. Los resultados del metaresistoma relativo a la familia de antibióticos de las quinolonas puede ser considerado un buen indicador de la acción antrópica. Dado que este tipo de quimioterápicos son de síntesis artificial su presencia así como la selección de cepas resistentes en el medio natural solo puede explicarse como resultado de la actividad humana. Habida cuenta de que la resistencia a este tipo de antibióticos está medida principalmente por mutaciones puntuales en las topoisomerasas, la desaparición de una posible presión selectiva podría no comportar la desaparición de cepas resistentes incluso por largos periodos de tiempo. Del mismo modo, la presencia de cepas resistentes en el medio natural podría interpretarse como resultado de una contaminación antigua a modo de "huella de la acción antrópica"
4. El análisis de las comunidades bacterianas rizosféricas realizado mediante Biolog ECO, analizando el CLPP, nos indica que el efecto de las aguas contaminadas sobre la rizosfera de las dos plantas analizadas es claro:
 - a) La cinética metabólica (utilización de distintas fuentes de carbono y nitrógeno por las comunidades a lo largo del tiempo) indica una reducción en la cinética de las muestras procedentes de rizosfera contaminada (CA>CB).
 - b) Los valores de diversidad metabólica son mínimos y diferentes significativamente en la muestra CA. Esta *simplificación del sistema* la relacionamos hipotéticamente con una sustitución de la comunidad rizosférica original por otra alóctona, de baja complejidad (oligopoblacional) procedente del agua contaminada con capacidad para colonizar la rizosfera.
 - c) El ACP realizado con los datos de CLPP discrimina claramente las muestras de rizosfera de suelo contaminado de las de suelo limpio respecto al componente principal 1, y el tipo de planta con respecto al componente principal 2.
 - d) Considerando los factores de carga del ACP observamos un mayor consumo de ácidos orgánicos y aminoácidos por comunidades bacterianas de suelo limpio, que se podría relacionar con la naturaleza de los exudados de las plantas. En el caso de las muestras de suelo contaminado los principales factores de carga son los azúcares, probablemente procedentes de la materia orgánica degradada que acompaña las aguas residuales que de los exudados de las propias plantas.

5. El estudio realizado con placas Biolog ECO® analizadas desde distintos puntos de vista (cinético, diversidad metabólica y estructura funcional) indica que las comunidades bacterianas de la rizosfera de las plantas estudiadas se ven afectadas por el encharcamiento temporal de aguas deficientemente, o no depuradas.
6. Del mismo modo que en el caso de microbiota norma humana producirse desplazamientos de las poblaciones por la incorporación de patógenos (procesos diarreogénicos), en nuestros suelos estudiados encontramos que el descenso de la actividad y diversidad microbiana podría explicar que, de forma paralela, se produzca una selección positiva de cepas que, encaso de que porten mayor nivel de resistencia a antibióticos dando como resultado mayores niveles de resistencia en el metarresistoma. Esto es especialmente evidente para el caso de antibióticos beta-lactámicos y quinolonas de primera generación.

5. Bibliografía

Allen HK., Moe LA., Rodbumrer J., Gaarder A., Handelsman J. (2009). Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan Soil. *ISME J* 3: 243-251.

Alonso, A., Sanchez, P., Martinez, L.J. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol* 3: 1-9.

Baquero, F., Martinez, J.L., Canton, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in wáter environments. *Current opinion in Biotechnology* 19: 260-265.

Cabello, F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problema for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8: 1137-1144.

Cook K.L., Garland J.L., Layton A.C., Dionisi H.M., Levine L.H., Sayler G.S. (2006). Effect of microbial species richness on community stability and function in a model plant-based wastewater processing system. *Microbial Ecology* 52: 725-737.

De Weger L., Dunbar P., Mahafee W.F., Lugtemberg B., Sayler G.S.(1991). Use of bioluminescence markers to detect *Pseudomonas* spp. In the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 57: 3641-3644.

EUCAST 2013. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method. Version 3.0

Garcia-Villarco Velasco A., Probanza A., Gutierrez Mañero J.R., Ramos B., Lucas Garcia J.A. (2009). Functional diversity of rhizospheremicroorganismsfromdifferentgenotypes of Arabidobsisthaliana. *CommunityEcology* 10: 111-119.

Gelsomino A., Badalucco L., Ambrosoli R., Crecchio C., Puglisi E., Meli S.M. (2006). Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: a case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. *Soil Biology & Biochem.* 38: 2069-2080.

Harsh P.B., Tiffany L.W., Laura G.P., Simon G., Vivanco, J.M. (2006). The role of rootexudates in rhizosphereinteractionswithplants and otherorganisms. *AnnuRevPlantBiology* 57: 233-266.

LaPara TM., Burch TR., McNamara PJ., Tan DT., Yan M et al. (2011).Tertiary-treated municipal wastewateris a significantpointsource of antibioticresistance genes into Duluth-Superior Harbor. *EnvironSciTechnol* 45: 9543-9549.

Lynch, J.M. (1990). Therizosphere. (J.M. Lynch, Ed.) John Wiley&Sons, Chichester. 458 pp.

Martín Rocha J.M. (2014). Efecto del tipo de manejo agrario en *Olaea europea* sobre el metaresistoma y perfil metabólico (CLPP) de las comunidades bacterianas filosféricas y edáficas. Trabajo de fin de Grado, Universidad San Pablo C.E.U. 21pp.

Pei R., Kim S.C., Carlson K.H., Pruden A. (2006). Effect of riverland scape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res* 40: 2427-2435.

Petrovic M., Gonzalez S., Barceló D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal Chem* 22: 685-696.

Pruden A., Pei R., Storteboom H., Carlson K.H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ. Sci. Technol* 40: 7445-7450.

Ruiz Palomino M., Lucas García J.A., Ramos B., Gutierrez Mañero F.J., Probanza A. (2005). Seasonal Diversity changes in alder (*Alnus glutinosa*) culturable rhizobacterial communities throughout a phenological cycle. *Applied Soil Ecology* 29: 215-224.

Shiner E.K., Rumbaugh K.P., Williams S.C. (2005). Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acylhomoserinelactones. *FEMS Microbiol Rev* 29: 935-947.

Söderberg K.H., Probanza A., Jumpponen A., Baath E. (2004). The microbial community in the rhizosphere determined by community level physiological profiles (CLPP) and direct soil and cfu-PLFA techniques. *Elsevier- applied soil ecology* 25: 135-145.

Sofo, A., Ciarfaglia, A., Scopa A., Camele I., Curci M., Crecchio C., Xiloyannes C. (2014). Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. *Soil Use and Management* 30: 160-167.

Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (1999). Principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Prentice Hall: 550.