

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS EN UN RESERVORIO DE AGUA EN VENEZUELA. UNA APROXIMACIÓN A LA MULTIRRESISTENCIA BACTERIANA EN AMBIENTES NATURALES

Faustino Andreas Toba

Aura Falco

Carlos Andrés Aranaga

Guillermina Alonso

Abstract. Waters contamination by organic matter discharges represents a public health problem because it favors the selection of bacteria resistant to antimicrobials. At a global level, molecular epidemiology studies are being carried out to detect the incidence of bacteria with multiple resistances. In Venezuela, there are few investigations that characterize microbiologically water bodies. The Pao-Cachinche reservoir, located in the northern center of Venezuela, is used to supply water to nearby cities as well as for agricultural activities. The analysis of the presence and identification of bacteria was carried out, with samples taken during rainy and drought seasons, finding that the predominant genus was *Pseudomonas*. The isolates were tested for antimicrobial susceptibility,

detecting complex patterns of resistance to antibiotics and heavy metals. Given the relationship between multiresistance and plasmids, the presence of plasmids and their capacity for transfer through the conjugation process were studied. Overall, the results suggest that the bacterial population that inhabits this water reservoir presents plasmids, which code for resistance to various antimicrobial agents, and can potentially disseminate the markers they code.

Keywords: water reservoirs, contamination, resistance to antibiotics, heavy metals

Resumen: La contaminación de aguas por descargas de materia orgánica representa un problema de salud pública debido a que favorece la selección de bacterias resistentes a antimicrobianos. A nivel mundial se están realizando estudios de epidemiología molecular para detectar la incidencia de bacterias con resistencias múltiples. En Venezuela, son pocas las investigaciones que caracterizan microbiológicamente los cuerpos de agua. El embalse Pao-Cachinche, ubicado en el centro-norte de Venezuela, es utilizado para suministrar agua potable a las ciudades cercanas, así como para actividades agrícolas. Se realizó el análisis de la presencia e identificación de bacterias, con tomas de muestras durante temporadas de lluvias y sequía, encontrándose que el género predominante fue *Pseudomonas*. Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a los aislados, detectándose patrones complejos de resistencia a antibióticos y a metales pesados. Dada la relación que existe entre la multiresistencia y la presencia de plásmidos, se determinó la presencia de éstos y su capacidad de transferencia a través del proceso de conjugación y transformación. En conjunto los resultados sugieren que la población bacteriana que habita en este reservorio de agua presenta plásmidos, los cuales codifican para resistencia a diversos agentes antimicrobianos, que potencialmente pueden diseminar los marcadores que codifican.

Palabras clave: reservorios de agua, contaminación, resistencia a antibióticos, metales pesados.

1. INTRODUCCIÓN

Los ríos, lagos y estanques son fuentes importantes de agua potable. Para evitar la contaminación, las autoridades de salud pública deben regular las descargas de aguas residuales en los embalses y sus afluentes. No obstante, es una práctica común en países subdesarrollados que las aguas residuales se viertan directamente en las fuentes de agua y embalses, con consecuencias dramáticas para la salud humana [1]. Estas aguas residuales son una fuente importante de microorganismos patógenos que se encuentran en ambientes acuáticos.

En un reservorio de agua, el crecimiento y dominancia de algunos grupos bacterianos de importancia clínica depende de múltiples factores, tales como, las condiciones físicas y químicas del agua, la cantidad de material orgánico disuelto y otros contaminantes proporcionados por las descargas de aguas residuales no controladas de áreas urbanas e industriales. Las bacterias resistentes a los antibióticos, así como los mismos antibióticos y agentes biocidas se descargan en los reservorios desde los centros poblados del entorno [2]. La presencia de estos contaminantes proporcionan una fuerte presión selectiva a favor de aquellos microorganismos que poseen genes que confieren resistencia a antimicrobianos y/o para la capacidad de degradar compuestos particulares. Por lo tanto, no es sorprendente observar un aumento de cepas resistentes en aislamientos de fuentes ambientales y el suministro de agua contaminada [3, 4].

Con frecuencia, las propiedades relacionadas con la supervivencia bacteriana están codificadas por plásmidos transferibles, que aseguran su diseminación entre las poblaciones bacterianas. Por lo tanto, la resistencia bacteriana a diversos agentes antimicrobianos y metales pesados con frecuencia se encuentra en aislados bacterianos provenientes de ambientes contaminados, estando los sistemas genéticos predominantemente codificados por plásmidos [5, 6, 7, 8]. En una misma célula pueden residir plásmidos diferentes, capaces de coexistir si pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad. Además, estos plásmidos no solo portan un gen de resistencia, sino que en muchos casos, pueden codificar diversas resistencias en uno mismo [9]. Estos

determinantes genéticos favorecen la sobrevivencia de las bacterias que los portan en un ambiente adverso, o le proporcionan una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la misma especie o no, que comparten el mismo nicho ecológico. Eventualmente, en ambientes con una alta presión selectiva, estos determinantes pueden convertirse en indispensables para la viabilidad celular [10, 11]. También se ha demostrado la transferencia en condiciones en las cuales, aparentemente, no existe una ventaja selectiva [12]. De hecho, hay evidencia que apoya la transferencia de genes por conjugación y transformación, entre la flora bacteriana de ambientes acuáticos y terrestres. Incluso, aun cuando los conteos viables en estos hábitats son generalmente más bajos que aquellos necesarios para la conjugación *in-vitro*, la transferencia pudiera ocurrir a una mayor frecuencia tomando en cuenta la formación de biopelículas. Se ha demostrado que la transferencia horizontal de genes entre las bacterias en los sistemas acuáticos naturales se produce, fundamentalmente, por conjugación y transformación [13]. Por lo tanto, en condiciones adecuadas, las bacterias podrían ser capaces de transferir y recibir material plasmídico durante la supervivencia en agua dulce. Durante estos procesos, las bacterias adquieren genes de resistencia a diversos agentes antimicrobianos, lo que genera dificultades en el manejo de las infecciones. Todos los mecanismos de transferencia genética son importantes para la evolución de las poblaciones bacterianas. La generalización de estos procesos de transferencia y movilización del material genético, ocurren en una comunidad bacteriana que comparte un grupo de genes, en un ambiente específico, los cuales están disponibles para cualquier célula bacteriana, en la que las barreras entre las especies, si no son nulas, están muy disminuidas. Así, la comunidad de bacterias de un ecosistema, más específicamente, el bacterioplancton de un ambiente acuático, se puede interpretar como un conjunto de organismos unicelulares que comparten y movilizan marcadores genéticos, utilizando como principales vehículos algunos elementos accesorios, como los plásmidos. La microbiología de los ecosistemas se interesa sobre todo en dos aspectos, identificar los microorganismos existentes y determinar la naturaleza y el grado de sus actividades metabólicas. La diversidad bacteriana presente en los cuerpos de agua es enorme. En el banco de datos se han repor-

tado más de 40.000 especies, pero se estima que los océanos pueden contener más de 2 millones de bacterias diferentes, mientras que en el suelo pueden habitar unos 4 millones, lo que ejemplifica la alta diversidad y el poco conocimiento existente de estos microorganismos procariotas.

Debido a la contaminación existente sobre los cuerpos de agua a nivel mundial, es de gran interés el estudio de aquellas fuentes de agua que están destinadas al consumo de las poblaciones, entre las cuales se encuentran los embalses. El incremento de desechos orgánicos u otros tipos de desechos en estos cuerpos de agua cambia las condiciones del sistema, generando así una presión selectiva sobre los organismos que allí habitan. Esta presión selectiva ha generado el incremento de cepas bacterianas resistentes a diversos factores, desde desinfectantes de uso clínico y antibióticos, hasta metales pesados. El uso de los antimicrobianos en las prácticas agrícolas y con propósitos veterinarios, junto con las descargas de aguas cloacales, ha resultado en un incremento significativo de bacterias resistentes a antibióticos en los ambientes acuáticos [14]. Debido a que los antimicrobianos son excretados por los animales, estos se pueden filtrar por la tierra y llegar a las aguas subterráneas, alcanzando de este modo a los ambientes acuáticos, con una distribución bastante amplia [2]. Las grandes descargas de antibióticos y otros antimicrobianos, y su circulación en los ambientes naturales, generan una presión selectiva, de modo que las bacterias presentes en estos ambientes representan un reservorio de determinantes de resistencia, medio propicio para la diseminación y la evolución de los genes de resistencia. La incidencia elevada de bacterias multirresistentes en los ambientes acuáticos a nivel mundial, agrava el problema de la alta frecuencia de cepas resistentes a distintos antibióticos, justificado con razones de peso la necesidad de establecer controles sobre la presencia de microorganismos potencialmente patógenos en estos hábitats, y sobre los procesos de transferencia genética en estos ambientes.

El estudio de las comunidades microbiológicas ha adquirido gran relevancia para los científicos, en especial en aquellos ambientes contaminados por actividades antropogénicas. La identificación y la

caracterización de la diversidad microbiana, así como su función en un determinado ecosistema, puede aportar evidencia para establecer nuevas estrategias para la recuperación de los ambientes. A pesar de esto, los estudios sobre la ecología microbiana de los sistemas tropicales son particularmente escasos. A pesar de la importancia potencial para la diseminación de los determinantes de resistencia, existe una considerable falta de información sobre la contaminación bacteriana en los reservorios de agua venezolanos, ya que los estudios se han enfocado, fundamentalmente, hacia el conteo de coliformes fecales para evaluar la calidad bacteriológica, y realizar las recomendaciones pertinentes de acuerdo a normas para la clasificación y control de la calidad de los cuerpos de agua. Pocos estudios se han realizado para conocer la composición de la comunidad bacteriana en estos nichos ecológicos, y mucho menos conocer los determinantes de resistencia presentes en esas comunidades.

El embalse Pao-Cachinche es un reservorio de agua utilizado como fuente de abastecimiento de agua potable a densas regiones urbanas del centro-norte del país [15, 16, 17, 18]. El embalse ha sufrido el impacto de la contaminación como consecuencia de una serie de factores, que confluyen en el aporte excesivo de nutrientes al embalse a lo largo de varias décadas, como: el crecimiento urbanístico, la agricultura intensiva, las granjas avícolas y porcinas, la ganadería menor y la deforestación de las cuencas de drenaje. Estos factores sumados a la imposibilidad de mezcla natural por acción del viento, han producido fuertes impactos en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de este cuerpo de agua.

El objetivo del presente estudio es la caracterización de bacterias cultivables aisladas del embalse Pao-Cachinche, y establecer los patrones de resistencia a diversos agentes antimicrobianos comúnmente utilizados en la salud humana y/o la cría de animales, y compuestos tóxicos industriales descargados en el embalse. Los resultados revelaron patrones complejos de resistencia a una gran cantidad de antibióticos y metales pesados, y la presencia de plásmidos movilizables en la población bacteriana analizada, los cuales codifican para resistencias a diversos agentes antimicrobianos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción del lugar.

Figura 31. Mapa del Embalse Pao-Cachinche, mostrando las estaciones de muestreo. Se señalan los sitios de toma de muestras (E1, E2). [Tomado y modificado de González y colaboradores, 2004].



El embalse Pao-Cachinche (Fig. 31) se ubica en la región centro-norte de Venezuela ($9^{\circ}53' N$ - $68^{\circ}08' W$), a una cota de 353 m.s.n.m., ocupando un área de 16.100.00 m², con un volumen de 170.000.000 m³, una profundidad media de 10,6 m y un área de la cuenca de 940 km², y entró en funcionamiento en el año 1974. Este embalse represa al río Pao y sus afluentes principales son los ríos Paíto y Chirgua. El gasto regulado por la toma es de 7 m³/s, lo que permite calcular un tiempo de renovación de 281 días. Es empleado para el abastecimiento de agua potable a los centros poblados vecinos y el riego de 6.000 ha. con fines agrícolas. El río Paíto transporta aguas residuales y domésticas, mientras que el río Chirgua transporta las aguas provenientes de granjas avícolas y porcinas. El embalse está rodeado de marraneras y granjas avícolas, recibiendo una carga alta de nutrientes, principalmente del río Paíto, con predominancia del fósforo [17, 18].

2.2. Colecta de muestras.

Los métodos utilizados para la recolección de muestras fueron descritos previamente por González [17]. Las muestras de agua fueron colectadas en frascos estériles, a diferentes profundidades (10, 15 y 20 metros) y en dos lugares diferentes del embalse. En la estación E1, que está ubicada en el brazo oeste del embalse, al lado de la torre-toma y frente al dique. Se encuentra cerca del canal principal del río Pao y del aliviadero, y de ella se extraen las aguas antes de ser potabilizadas en una planta de tratamiento. Su profundidad promedio fue de 23,9 m. En la estación E2, que está ubicada en el brazo este del embalse, que se encuentra unido al brazo oeste por un canal estrecho y somero (Fig. 31). En esta zona desembocan las aguas de los tributarios Paya, Pirapira y San Pedro. Su profundidad promedio fue de 17,5m. El muestreo se realizó en dos períodos del año: comienzos de la estación seca (noviembre) y comienzos de la temporada de lluvias (mayo).

2.3. Procesamiento de la muestra.

Las muestras de agua se procesaron para el análisis microbiológico, dentro de las 24 horas siguientes a la toma. El cálculo del número de bacterias cultivables totales se realizó por siembra de diluciones seriadas de las muestras de aguas, que posteriormente fueron incubadas a 30°C y 37°C hasta por 72 horas. Los títulos (número de bacterias por ml) se establecieron de acuerdo al número total de colonias desarrolladas en las placas, independientemente de su morfología, utilizando la siguiente ecuación: Título bacteriano= Número de colonias x Factor de dilución/Volumen de Siembra (ml). Una vez obtenido el título bacteriano, el estudio de las diversas poblaciones bacterianas se realizó identificando una colonia representativa de cada grupo, al seleccionar diferentes tipos de colonias dependiendo de su morfología (forma, tamaño, bordes y pigmentación), las cuales posteriormente fueron inoculadas en placas de agar LB para obtener colonias puras. Una vez obtenidas las colonias puras, se inocularon sobre placas de Agar LB y Agar MacConkey, incubándolas hasta por 72 horas. De la placa de Agar LB, se tomaron colonias aisladas para proceder a realizar las pruebas de identificación, y a cada colonia se le asignó un código que permitió distinguir: sitio de toma, muestra y año.

2.4. Identificación de los aislados bacterianos.

Las cepas bacterianas fueron aisladas, identificadas y preservadas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) [19]. La selección de las pruebas bioquímicas y las galerías de identificación del sistema comercial automatizado ATB/Plus (BioMérieux, St Louis, MO, USA) se orientó de acuerdo a los resultados de la coloración de Gram. La identificación fue corroborada por pruebas bioquímicas adicionales.

2.5. Determinación de la resistencia a antibióticos.

Los fenotipos de resistencia a los antibióticos se determinaron mediante el crecimiento en medio sólido suplementado con antibióticos, la prueba rápida de susceptibilidad ATB UR (BioMérieux) y el método de difusión en disco según las recomendaciones del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), como se describió previamente [20]. La interpretación de los tamaños de las zonas de inhibición siguió la recomendación del fabricante del disco. Se analizaron 14 antibióticos diferentes: amikacina ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), ampicilina ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefamandol ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefepima ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefonicid ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cefalotina ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), cloranfenicol ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), ciprofloxacina ($5 \mu\text{g.ml}^{-1}$), kanamicina ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$), ácido nalidíxico ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$), estreptomina ($25 \mu\text{g.ml}^{-1}$), sulfametoxazol/ trimetoprima ($25 \mu\text{g.ml}^{-1}$), tetraciclina ($15 \mu\text{g.ml}^{-1}$) y tobramicina ($4 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

2.6. Determinación de la resistencia a metales pesados.

La resistencia a diversos metales pesados y aniones se midió usando medio de cultivo suplementado con la sal respectiva [4]. Se llevaron a cabo determinaciones de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en medio Luria Broth (LB) líquido que contenía diversas concentraciones del compuesto bajo prueba. Las placas se incubaron a la temperatura apropiada hasta 72 horas. Las placas que contenían medio sin adición de metal se inocularon de la misma manera para emplearlo como control. Una vez estandarizadas las condiciones óptimas de crecimiento de los aislados bacterianos, se realizaron los crecimen-

tos con los metales tóxicos, estableciendo primero las condiciones para las cepas controles. La CMI se definió como la concentración más baja de metal que inhibía el crecimiento después de una incubación de hasta 72 h a la temperatura de crecimiento óptima. Los metales que se emplearon fueron: CdCl_2 , CoCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_2)_3$, ZnSO_4 , HgCl_2 y NiSO_4 , K_2TeO_3 y VoSO_4 y CuSO_4 .

2.7. Determinación de la presencia de plásmidos.

Se examinaron múltiples bacterias resistentes a antimicrobianos con el fin de detectar la presencia de plásmidos. Para ello, se utilizó el procedimiento de extracción alcalina [21] y la técnica para el aislamiento de plásmidos grandes y pequeños descrita por Kado y Liu [22].

Los plásmidos aislados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, y visualizados con un equipo Gel Doc 1000 (BioRad) y el programa Multi-Analyst (BioRad).

2.8. Transferencia de plásmidos.

La transferencia de la información genética a través de plásmidos se estudió realizando ensayos de conjugación y transformación, empleando diferentes cepas receptoras donadas por el CVCM (Tabla 4). La selección de la cepa receptora se realizó en función del género de la cepa donante y su relación filogenética con la misma. Los experimentos de transformación se llevaron a cabo utilizando el procedimiento de transformación química y/o electroporación [23]. Como cepas donantes se utilizaron cultivos de *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas cepacea* y *Pseudomonas* spp. Las bacterias transformadas se seleccionaron por resistencia a algunos marcadores de resistencia presentes en la respectiva cepa donante.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> DH5a	F, l, D (<i>lacZYA-argF</i>)U169, f80 <i>lacZ</i> , DM15, <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> .	CVCM125
<i>E. coli</i> DH5aMCR	F, l, D (<i>lacZYA-argF</i>)U169, f80 <i>lacZ</i> , DM15, <i>mcrA</i> , D (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>deoR</i> , <i>phoA</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> .	CVCM824
<i>E. coli</i> J53	F, pro, met	CVCM126
<i>E. coli</i> J62-2	F; his; lac; pro; trp; rif	CVCM131
<i>P. aeruginosa</i> PAO303	chl; rif; arg	CVCM409
<i>P. aeruginosa</i> PAO38	leu; rif	CVCM410

Los ensayos de conjugación consistieron en proporcionar un medio en el cual las cepas, donante y receptora, estén en contacto por un período de tiempo determinado [11]. Brevemente, se crecieron ambas cepas (donante y receptora) en medio LB durante una noche. Luego, se inocularon 0,2 ml de cada cepa, en 10 ml de caldo LB. Se incubó con agitación hasta que la donante alcanzó 2×10^8 cel/ml y la receptora $0,5 \times 10^8$ cel/ml. Luego se estableció una mezcla de conjugación en la que se inocularon 0,1 ml la cepa donante, más 0,4 ml de la receptora y 0,5 ml de caldo LB y se incubó a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , las cuales fueron sembradas en placas de selección de transconjugantes. Para estimar las poblaciones de células viables (donante y transconjugantes) se calculó el título bacteriano, que se empleó para calcular la frecuencia de transferencia, calculado mediante la siguiente ecuación: Frecuencia de transferencia = Título de transconjugantes/Título de donantes.

3. RESULTADOS

3.1. Recuento de bacterias viables y cultivables.

El título de las bacterias se determinó a partir de muestras recolectadas en las dos estaciones, a comienzos del periodo de sequía (noviembre) y a comienzos de la temporada de lluvias (mayo). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Títulos bacterianos obtenidos.

Estación (metros de profundidad)	Muestreo en noviembre (bacterias/ml)	Muestreo en mayo (bacterias/ml)
E1 (10)	$5,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^5$
E1 (15)	$9,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^4$
E1 (20)	$5,8 \times 10^3$	$7,0 \times 10^4$
E2 (10)	$5,0 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$
E2 (15)	$3,7 \times 10^4$	ND

ND: Muestra no tomada, el embalse no alcanza este nivel de profundidad en esta Estación.

3.2. Identificación bacteriana.

Del crecimiento bacteriano obtenido para el recuento, se seleccionaron 60 aislados bacterianos, con base en morfología de las colonias. De la identificación preliminar, y eliminando repeticiones de especies, se seleccionaron 12 aislados representativos de la comunidad para la caracterización de las resistencias a antimicrobianos (Tabla 6) y metales pesados (Tabla 7). La distribución de las poblaciones bacterianas varió de acuerdo a los cambios climáticos. En ambas estaciones, el 50% de los aislamientos se identificaron como *Pseudomonas spp.*, con mayor predominancia al inicio de la temporada de lluvias (muestreo del mes de mayo) alcanzando más del 70% de la composición de la comunidad. Otros géneros identificados fueron *Bacillus*,

Micrococcus, *Enterobacter* y *Orskovia*. Se detectó la presencia minoritaria (1%) de bacilos Gram-positivos.

Tabla 6. Resistencia bacteriana a antibióticos

Bacteria	AMP	CLO	KAN	NAL	STR	TET	AMI	CCD	CTN	CPM	CIP	CMA	SXT	TOB
<i>Bacillus</i> sp.	R	S	S	S	S	S	S	ND						
<i>Orskovia</i> sp.	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
<i>Micrococcus roseus</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Micrococcus luteus</i>	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S
<i>Pseudomonas cepacia</i>	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S
<i>Pseudomonas</i> sp.	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S

Abreviaturas: Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CLO), Kanamicina (KAN), Acido Nalidíxico (NAL), Estreptomina (STR), Tetraciclina (TET), Amicacina (AMI), Cefonicida (CCD), Cefalotina (CTN), Cefepima (CPM), Ciprofloxacina (CIP), Cefamandol (CMA), Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), Tobramicina (TOB) ND: no determinado.

Tabla 7. Resistencia bacteriana a metales pesados

Bacteria	Hg 0,5 mM	Cu 3,6 mM	Te 10 mM	Ni 4,5 mM	Pb 10,5 mM	Zn 4,5 mM	V 25 mM	Co 4,5 mM	Cd 4 mM	Determi- nantes de resistencia	Moléculas plasmídicas visualizadas
<i>Bacillus</i> sp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0
<i>Orskovia</i> sp.	S	S	R	R	S	S	R	S	S	13	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	R	11	6
<i>Micrococcus roseus</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	5	4
<i>Micrococcus luteus</i>	S	S	R	S	S	S	R	S	S	9	4
<i>Pseudomonas cepacia</i>	R	S	R	S	R	S	S	S	S	12	4
<i>Pseudomonas sp.</i>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	7	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	5	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	S	S	R	S	S	R	S	S	6	1
<i>Micrococcus byla</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	R	S	R	S	R	S	S	S	S	11	5
<i>Pseudomonas alkaligenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6	1

Abreviaturas: Hg: Mercurio, Cu: Cobre, Te: Telurit, Ni: Níquel, Pb: plomo, Zn: Zinc, V: Vanadio, Co: Cobalto, Cd: Cadmio. **R**: resistente, **S**: sensible, **ND**: No determinado.

3.3. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

3.3.1. Antibióticos

Se estudió la capacidad de crecimiento en presencia de los antibióticos de uso común en las prácticas sanitarias y en la atención veterinaria (Tabla 6). Todas las cepas analizadas fueron resistentes, al menos, a uno de los antibióticos evaluados. El 91% fue resistente a al menos cuatro antibióticos, mientras que el 33% fue resistente hasta a siete antibióticos. Además, el 16% mostró resistencia al menos a nueve de los agentes antimicrobianos probados. Todas las cepas mostraron resistencia a cefalotina (cefalosporina de primera generación), cefepima (cuarta generación de cefalosporina) y trimetoprim sulfametoxazol. Ninguna de las cepas fue resistente a cloranfenicol, a ciprofloxacina (fluoroquinolona) ni a tobramicina (aminoglucósido).

3.3.2. Metales pesados.

Se ha sugerido que no existen concentraciones aceptables de iones metálicos que puedan usarse para distinguir bacterias resistentes de sensibles. Sin embargo, el rango de concentraciones para todos los metales pesados analizados, fue similar al utilizado previamente en estudios sobre tolerancia de metales [24, 8]. Se realizaron pruebas para detectar resistencia a cobre, mercurio, telurito, níquel, plomo, zinc, vanadio, cobalto y cadmio. Estos elementos se seleccionaron en base a las actividades industriales llevadas a cabo en las adyacencias del reservorio de agua. Los resultados se muestran en la Tabla 7. El 50% de las cepas ensayadas mostraron resistencia al menos a dos de los metales probados. El aislado clasificado como *Enterobacter cloacae* exhibió resistencia a siete de los nueve metales ensayados. No se detectó ningún aislado bacteriano con resistencia al cobalto, bajo las condiciones ensayadas.

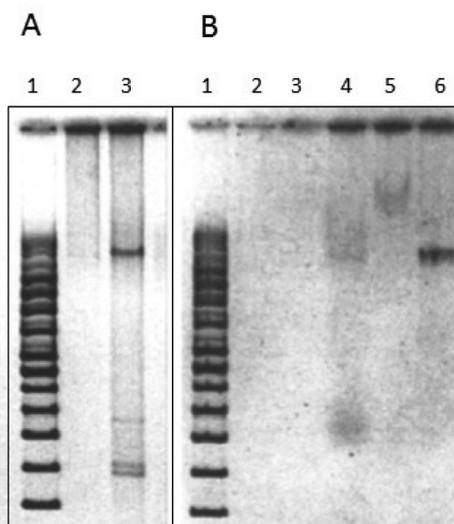
Los resultados generales de resistencia a los antimicrobianos mostraron que el 75% de las cepas aisladas expresaron resistencia al menos a seis de los 23 agentes antimicrobianos ensayados, siendo *Oerskovia* sp, *En-*

terobacter cloacae y *Pseudomonas cepacea* las que exhibieron fenotípicamente un mayor número de determinantes de resistencia.

3.4 Aislamiento y caracterización de plásmidos

La presencia de ADN plasmídico se determinó empleando electroforesis en geles de agarosa reveló la presencia de bandas discretas de moléculas superenrolladas (Figura 32). El 80% de las bacterias evaluadas fueron portadoras de uno o más plásmidos (Tabla 7), con un tamaño variable de 2,8 a más de 60 kpb. No se detectaron patrones comunes de tamaño de plásmidos. *Enterobacter cloacae*, que exhibe resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos, contiene hasta seis moléculas de plásmido diferentes. Hasta el momento, la presencia de plásmidos en *Orskovia* no ha sido detectada por los métodos utilizados.

Figura 32. Registro fotográfico de la corrida electroforética del aislamiento de plásmidos. A: Aislamiento de ADN plasmídico empleando el método de lisis alcalina. Carril 1: Marcador de tamaño molecular ADN circular superenrollado (Promega), Carril 2: cepa de *E. coli* J53 (control sin plásmidos), Carril 3: *Pseudomonas cepacea*. B: Aislamiento de DNA plasmídico empleando el método de Kado y Liu. Carril 1: Marcador de peso molecular ADN circular superenrollado (Promega), Carril 2: cepa de *E. coli* J53 (control sin plásmidos), Carril 3: cepa de *E. coli* DH5a (control sin plásmidos), Carril 4: *Pseudomonas* sp, Carril 5: *Pseudomonas aeruginosa*, Carril 6: *Pseudomonas fluorescens*.



Debido a que todas las bacterias examinadas fueron aisladas de un ambiente contaminado, se sospecha que están sometidas a altas presiones selectivas y, en consecuencia, comparten algunos de los determinantes de resistencia detectados. Con el fin de establecer una relación entre las moléculas plasmídicas y los fenotipos de resistencia, se llevaron a cabo experimentos para determinar la capacidad de transferencia de estas moléculas plasmídicas. Ningún plásmido fue movilizado por conjugación, en las condiciones utilizadas. Por lo tanto se realizaron ensayos de transformación, utilizando el aislamiento plasmídico de las cepas estudiadas. Se obtuvieron resultados positivos con los plásmidos de *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas cepacea* y *Pseudomonas* sp. La caracterización fenotípica de las células transformantes permitió detectar que ocurrió co-transferencia simultánea de varios determinantes de resistencia.

4. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios en los cuerpos de agua realizados en Venezuela, se han enfocado en la determinación y cuantificación de coliformes totales y/o fecales. Este trabajo fue enfocado como un estudio microbiológico preliminar de la comunidad bacteriana presente en el embalse Pao-Cachinche, ubicado en la región centro-norte de Venezuela.

Este embalse es la fuente principal de abastecimiento de agua para la planta “Alejo Zuloaga”, que suministra agua potable a tres millones de personas aproximadamente, ubicadas en varias localidades de los estados Carabobo y Cojedes; además de surtir agua para desarrollar diversas actividades agropecuarias.

Éste, al igual que otros embalses, está sufriendo un proceso de eutrofización debido al vertimiento de aguas domésticas sin tratamiento o con tratamiento deficiente, que provienen en su mayoría de la ciudad de Valencia, así como de aguas de desecho desde granjas avícolas y porcinas cercanas [15, 17, 18].

Al comienzo de la temporada de lluvias los afluentes de Pao-Cachinche introducen la materia orgánica y nutrientes acumulados durante la estación seca, lo que causa el aumento de la mayoría de los parámetros fisicoquímicos estudiados [17], lo que a su vez trae como consecuencia, un aumento en la abundancia de bacterias, tal como se observó en la estación E1, en la que los títulos bacterianos fueron 10 veces más altos en mayo que en noviembre, mientras que en la estación E2 el título permaneció invariable en las dos épocas estacionales (Tabla 5). Posiblemente, este comportamiento se debe a que la estación E2 se encuentra aguas arriba de la estación E1, lo cual trae como consecuencia que las descargas de materia orgánica durante la época de lluvia, sea arrastrada hacia la estación E1.

La distribución de las poblaciones bacterianas varió de acuerdo con los cambios climáticos de las temporadas de muestreo. En el período de inicio de la sequía (noviembre), se determinó que predominaban las bacterias pertenecientes al grupo coriniforme (*Oerskovia*), aunque también se encontraron *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas vesicularis*. Igualmente, en esta época, cuando llegan con más caudal los afluentes provenientes de las granjas avícolas y porcinas, con poca afluencia de aguas de arrastre originadas por lluvias, se observa la presencia de *Enterobacter cloacae*, con mayor predominio en la estación E2 (datos no mostrados).

Con respecto a la abundancia de las especies bacterianas, se pudo determinar que en ambas estaciones predominaron las bacterias Gram-negativas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Tabla 6), que se caracterizan por ser ubicuas. Sin embargo, es importante destacar que en estas muestras de agua pueden estar presentes otras especies bacterianas (cultivables y no cultivables) en una menor proporción, pero que no están incluidas en este estudio. En un futuro, serán investigadas aplicando métodos de enriquecimiento adicionales y condiciones de selección apropiadas, así como estudios metagenómicos.

Con respecto a los perfiles de resistencia a antimicrobianos, se pudo evidenciar que todos los aislados bacterianos presentaron resistencia

al menos a uno de los antibióticos ensayados (Tabla 6). Más específicamente, se encontró que las bacterias del género *Pseudomonas* fueron resistentes al menos a cuatro de los antibióticos ensayados, mientras que *Bacillus* spp. fue el único aislado que presentó un solo determinante de resistencia (ampicilina) (Tabla 6). Precisamente, el 66,6% de los aislados fueron resistentes a este antibiótico beta-lactámico, muy probablemente debido a que este antimicrobiano se utiliza ampliamente en la práctica clínica, lo cual confiere ventaja en ambientes en los que se encuentra la presión selectiva. La presencia de bacterias multirresistentes a los antibióticos en ambientes acuáticos ha sido ampliamente reportada a nivel mundial [25, 26, 27, 28], pero son pocos los reportes a nivel Latinoamericano.

La presencia de bacterias multirresistentes en el embalse Pao-Cachinche podría representar un posible peligro para la salud debido a la ingesta accidental de estas aguas por parte de seres humanos y/o de animales, debido a los patrones de resistencia a antibióticos que presentan los géneros bacterianos identificados. Un ejemplo de ello podrían ser *P. fluorescens* y *Micrococcus roseus*, que usualmente se encuentran en ambientes acuáticos y en el suelo, y que generalmente no se asocian con infecciones en humanos, a excepción de personas con compromisos en el sistema inmunitario. Sin embargo, una vez que ingresa al cuerpo, puede causar cuadros de septicemia severos, y cuyo manejo terapéutico se complicaría debido a los perfiles de resistencia combinados que presentan a beta-lactámicos como: cefonida (cefalosporina de segunda generación), cefalotina (cefalosporina de primera generación), cefamandol (cefalosporina de tercera generación) y a trimetoprim-sulfametoxazol (sulfonamida).

Tanto los antibióticos beta-lactámicos como las sulfonamidas son ampliamente empleados en la práctica clínica y veterinaria, y junto con la práctica de la automedicación, ejercen una presión selectiva que favorece a aquellas bacterias que poseen los determinantes de resistencia a antibióticos. Como una estrategia para contener el aumento de la resistencia bacteriana en Venezuela, el 2 de enero de 2006, se publicó la resolución N° 604 de la Gaceta Oficial Venezolana N° 38.348, que sigue vigente, mediante la cual la dispensación de

medicamentos antimicrobianos en farmacias, servicios farmacéuticos y cualquier otro establecimiento debidamente autorizado debe realizarse mediante la presentación de la prescripción facultativa. Los medicamentos antimicrobianos aludidos en la resolución son aquellos de uso sistémico de las siguientes clases: fluoroquinolonas, macrólidos—lincosamidas, cefalosporinas de tercera generación, y aquellos cuyo principio activo sea rifampicina. Sin embargo, se ha reportado la ausencia de cambios en las tendencias de consumo de los antimicrobianos después de la aplicación de esta normativa [29, 30]. Es por este motivo que se sugiere la implementación de estrategias complementarias a la regulación de la dispensación de antibióticos para lograr el éxito de dicha medida.

La multirresistencia a antibióticos está muy relacionada con la resistencia a metales pesados. Para completar la caracterización fenotípica de las bacterias aisladas del embalse Pao-Cachinche también se realizaron pruebas de resistencia a sales de cobre, mercurio, telurito, níquel, plomo, zinc, vanadio, cobalto y cadmio. A nivel internacional, las áreas contaminadas por metales pesados usualmente están asociadas a actividades humanas como la descarga de desechos, derrames accidentales de diversas industrias metalúrgicas o la minería. Las sales y los compuestos metálicos también se usan a menudo como agentes antimicrobianos en medicina y como biocidas en hospitales y otros entornos. Las bacterias, que sobreviven en tales ambientes, han desarrollado o adquirido sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las altas concentraciones de iones metálicos. En este estudio, más del 70% de las cepas presentó resistencia al menos a dos de estos elementos. Entre las bacterias estudiadas destacó el aislado de *Enterobacter cloacae* que exhibió resistencia a siete de los nueve metales ensayados. Ninguna cepa evidenció resistencia fenotípica al cobalto.

Durante la evolución bacteriana, la habilidad de las bacterias para dominar nuevos ambientes y responder a presiones diferentes, puede ser explicada por la adquisición y selección de nuevos genes por transferencia horizontal, más que por modificaciones secuenciales debidas a la acumulación de mutaciones puntuales. Por ejemplo: la

diseminación de los genes de resistencia a antibióticos y de los genes capaces de degradar compuestos xenobióticos y tóxicos, es debida, principalmente, a la transferencia horizontal de estos marcadores, seleccionados por el aumento en las concentraciones de estos compuestos en el ambiente. El principal vehículo para esta transferencia horizontal son los plásmidos, los cuales pueden transportar a otros elementos accesorios, como por ejemplo: los transposones y las secuencias de inserción, entre otras. Debido a la estrecha relación que existe entre la resistencia a antibióticos y a metales pesados en plásmidos, se procedió a determinar la presencia de estas moléculas extracromosomales en los aislados bacterianos en estudio. Los resultados permitieron evidenciar la presencia de plásmidos en más del 80% de las cepas analizadas. Siete de ellas poseen al menos dos bandas claramente diferentes. Los tamaños de las moléculas extracromosomales varían desde 2,8 kpb hasta más de 20 kpb. En el caso de *Enterobacter cloacae*, uno de los aislados con mayor número de determinantes de resistencias, presentó seis moléculas distintas. Con respecto a las bacterias que no resultaron positivas a la presencia de plásmidos, no se puede asegurar que carecen de ellos, sino que no pudieron ser detectados con los métodos utilizados.

La dispersión de moléculas plasmídicas que contienen determinantes de resistencia a antibióticos en ambientes naturales, es un problema de gran importancia. La constante introducción de nuevos antimicrobianos, y la subsiguiente selección de nuevos mecanismos de resistencia, ocasiona una problemática grave a la hora de tratar a los pacientes con infecciones bacterianas. Son muchos los estudios que se han realizado en ambientes hospitalarios para conocer la dispersión de estas bacterias, sin embargo, en Venezuela no se realizan frecuentemente en ambientes naturales. Los resultados aquí reportados permiten sugerir que las bacterias que albergan plásmidos con determinantes de resistencia a antibióticos y metales pesados, y que están en ambientes acuáticos, participan como posibles cepas donantes que contribuyen a la propagación de estos genes.

Estas bacterias estudiadas provienen de un ambiente con una fuerte presión selectiva, comparten marcadores de resistencia a diversos

agentes antimicrobianos, y en su mayoría portan plásmidos, los cuales podrían ser transferibles. Para demostrar este punto, se realizaron ensayos de transferencia del material genético. Los resultados obtenidos indican que se logró transformar a una cepa receptora de *Escherichia coli* con el material genético extracromosomal de cuatro de las cepas en estudio, ubicadas taxonómicamente en otros géneros bacterianos, comprobándose la transferencia de los marcadores de resistencia presentes en ellas. Los resultados revelan que no solo se transmite la resistencia por la cual se seleccionaron las diferentes transformantes, sino que adicionalmente se co-transferen varios marcadores. Los ensayos de transferencia por conjugación no fueron exitosos, pero se debe tener en cuenta que, si bien estos protocolos de conjugación permiten detectar la transferencia de material plasmídico, no se aproximan a las condiciones en las que la conjugación se lleva a cabo en el ambiente. En la mayoría de los casos las bacterias se encuentran formando biopelículas, en condiciones de escasez de nutrientes, las cuales son muy distintas a las empleadas en los protocolos estándares de conjugación con células planctónicas en medios nutritivos. Se ha reportado que existe una conexión entre la conjugación bacteriana y la formación de biopelículas. Esto sugiere que una consecuencia ecológica importante derivada del uso de los antibióticos y los biocidas en la medicina, veterinaria y la agricultura, puede haber sido la selección de cepas que contengan plásmidos y que sean aptas para formar o estar presentes en biopelículas. Se plantea para el futuro realizar más ensayos de conjugación en condiciones de formación de biopelículas con las cepas estudiadas.

Debido a que la contaminación ha alcanzado niveles alarmantes, el embalse Pao-Cachinche fue declarado en emergencia, y sometido a la aplicación de un proceso de desestratificación artificial [31], el cual controló efectivamente los efectos de eutrofización después de un año de operación continua. En la actualidad se realiza un estudio microbiológico de muestras tomadas después de la medida de mitigación (manuscrito en preparación), para comparar con los resultados obtenidos.

3. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que en el embalse Pao-Cachinche existe una biodiversidad bacterianas, que se caracteriza por presentar moléculas de ADN plasmídico que les confieren resistencia a antibióticos y a metales pesados, y que potencialmente, podrían transmitir estos determinantes a través de los diversos mecanismos de la transmisión de la información genética.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación e Innovación PEII No.2012000977 (Caracas, Venezuela), otorgado a Guillermina Alonso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Fogarty J., Thornton L., Hayes C., Laffoy M., O'Flanagan D., Devlin J., Corcoran R. "Illness in a community associated with an episode of water contamination with sewage". *Epidemiology and Infection*, vol. 114, no. 2, pp. 289-295. Abr 1995.
- [2] Kummerer K. "Resistance in the environment". *J Antimicrobial Chemother*, vol. 54, no. 2, pp. 311-320. Ago 2004.
- [3] Campeau R.C., Gulli L.F., Graves J.F. "Drug resistance in Detroit river Gram-negative bacilli". *Microbios*, vol. 88, no. 357, pp. 205-212. 1996.
- [4] Goñi-Urriza M., Capdepuuy M., Arpin C., Raymond N., Caumette P., Quentin C. "Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp". *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, no. 1, pp: 125-132. Ene 2000.
- [5] Gupta A., Kazuaki M., Lo J.F., Silver S. "Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*". *Nature Medicine*, vol. 5, no. 2, pp: 183-188. Feb 1999.
- [6] Nies D.H. "Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes". *Plasmid*, vol. 27, no. 1, pp. 17-28. Ene 1992.
- [7] Silver S. "Genes for all metals – a bacterial view of the periodic table". *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 20, no. 1, pp. 1-12. Ene 1998.
- [8] Alonso G., Vilchez G., Bruzual I., Rodríguez-Lemoine V. "Characterization of plasmid MIP233 (IncHI3) of the H complex". *Research in Microbiology*, vol. 153, no. 3, pp. 149-153, Abr 2002.
- [9] Kado C.I. "Origin and evolution of plasmid". *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 73, no. 1, pp: 73117-126. Ene 1998.
- [10] Alonso G., Baptista K., Ngo T., Taylor D.E. "Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHI1 plasmid R27". *Microbiology*, vol. 151, no. 11, pp. 3563-3573, Nov 2005.

- [11] Redondo C., Alonso G. “Plásmidos conjugativos aislados de cepas multiresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas”. *Rev Soc Ven Microbiol*, vol. 27, no. 2, pp. 100-107. 2007.
- [12] Arango Pinedo, C., B.F. Smets. “Conjugal TOL Transfer from *Pseudomonas putida* to *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of Restriction Proficiency, Toxicant Exposure, Cell Density Ratios and Conjugation Detection Method on Observed Transfer Efficiencies”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 51-57. Ene 2005.
- [13] Stewart G., Sinigalliano C. “Detection and characterization of natural transformation in the marine bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell”. *Arch Microbiol*, vol. 152, no. 6, pp. 520–526. Jul 1989.
- [14] Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., Manaia, C. M. “Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome”. *FEMS Microbiol Rev*, vol. 38, no. pp. 761–778. Jul 2014.
- [15] González, E.J.; Ortaz M.; Matos, M.L.; Mendoza, J.; Peñaherrera, C., Carrillo, V.M. “Zooplankton de dos embalses neotropicales con distintos estados tróficos”. *Interciencia*, vol. 27, no. 10, pp. 551-558. Oct 2002.
- [16] González, E.J.; Ortaz, M.; Peñaherrera, C.; Montes, E; Matos M.L., Mendoza J. “Fitoplancton de cinco embalses de Venezuela con diferentes estados tróficos”. *Limnetica*, vol. 22, no. 1-2, pp. 15-35. 2003.
- [17] González, E. J., Ortaz, M., Peñaherrera, C., Infante A. “Physical and chemical features of a tropical hypertrophic reservoir permanently stratified”. *Hydrobiologia*, vol. 522, pp. 301-310. 2004.
- [18] González, E. J., Ortaz, M.; Peñaherrera C.; Matos M.L. “Fitoplancton de un embalse tropical hipereutrófico (Pao-Cachinche, Venezuela): Abundancia, biomasa y producción primaria”. *Interciencia*, vol. 29, no. 10, pp. 548-555. Oct 2004.
- [19] CVCM, Centro Venezolano de Colección de Microorganismos. Catálogo CVCM. Octava Edición. ISSN: 1316-3604. Ediciones CVCM. Caracas, Venezuela. 2013.

- [20] Angiolillo G., Fernandez S., Falco A., Aranaga C., Alonso G. "Characterization of plasmids from *E. coli* SXT resistant isolates from urinary tract infections in Venezuela". *Kasmera*, vol. 45, no. 2, pp. 17-31. Nov 2017.
- [21] Birnboim H.C., Doly J. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acid Research*, vol. 7, no. 6, pp. 1513-1523. Nov 1979.
- [22] Kado C.I.; Liu S.T. "Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids". *J Bacteriol*, vol. 145, no. 3, pp. 1365-1373. Mar 1981.
- [23] Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.
- [24] Nieto J.J., Fernández-Castillo R., Márquez M.C., Ventosa A., Quesada E., Ruiz-Berraquero F. "Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria", *Appl Environ Microbiol*, vol. 55, no. 9, pp. 2385-2390. Sep 1989. Alonso y col., 2002)
- [25] Yin, Q., Yue, D., Peng, Y., Liu, Y., & Xiao, L. "Occurrence and Distribution of Antibiotic-resistant Bacteria and Transfer of Resistance Genes in Lake Taihu". *Microbes and Environments*, vol. 28, no. 4, pp. 479-486. Nov 2013.
- [26] Nascimento, E., Araújo, M. "Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review". *Revista Ambiente & Água*, vol. 9, no. 2, pp. 239-249. May 2014.
- [27] Berglund, B. "Environmental Dissemination of Antibiotic Resistance Genes and Correlation to Anthropogenic Contamination with Antibiotics." *Infection Ecology & Epidemiology* 5. Sep 2015. Doi 10.3402/iee.v5.28564.
- [28] Azzam M, Ezzat S, Othman B, El-DougDoug K. "Antibiotics resistance phenomenon and virulence ability in bacteria from water environment". *Water Science*, vol. 31, no. 2, pp. 109-121. Oct. 2017.

- [29] Rivas P., Alonso G. “Regulación de la dispensación y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela”. *Revista Panamericana de Salud Pública*, vol. 30, no. 6, pp. 592–597. 2011.
- [30] Gomes C., Alonso G. 2013. “Regulación de la dispensación de antibióticos en Venezuela y resistencia bacteriana”. *VITAE Academia Biomédica Digital*, 55 <http://vitae.ucv.ve>.
- [31] González, E.J; Matos, M.L. Manejo de los Recursos Hídricos en Venezuela. Aspectos Generales. En: B. Jiménez-Cisneros y J.G. Tundisi (Eds.). ISBN: 978-607-9217-04-4. Diagnóstico del Agua en las Américas. Red Interamericana de Academias de Ciencias – Programa de Aguas, Foro Consultivo Científico y Tecnológico, AC. México: 437-447. 2012.