

*Higiene y Sanidad Ambiental*, **16** (4): 1461-1466 (2016)

## **Patrones de resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en el sedimento intermareal de la playa en Comodoro Rivadavia (Argentina)**

### ***ANTIBIOTIC RESISTANCE PATTERNS OF BACTERIA ISOLATED FROM INTERTIDAL SEDIMENT FROM SEDIMENT BEACH IN COMODORO RIVADAVIA (ARGENTINA)***

Romina DIAZ<sup>1</sup>, Oscar Hector PUCCI<sup>1,2</sup> y Graciela Natalia PUCCI<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Estudios e investigación en Microbiología Aplicada- Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ciudad Universitaria 4km, Comodoro Rivadavia, Chubut. Correo-e: granapu@unpata.edu.ar ; puccigraciela@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina.

#### **RESUMEN**

Se evaluaron patrones de resistencia a antibióticos a través del análisis discriminante en cepas aisladas de sedimento intermareal. La selección de bacterias resistentes se efectuó utilizando medios de cultivos líquidos usando como agentes cinco antibióticos en dos concentraciones: imipenem (16 µg/ml; 32 µg/ml), meropenem (16 µg/ml; 32 µg/ml), gentamicina (8 µg/ml; 16 µg/ml), clindamicina (2 µg/ml; 4 µg/ml), y ceftazidima (32 µg/ml; 64 µg/ml). Posteriormente se aislaron e identificaron las cepas y se sometieron a pruebas de sensibilidad por el método de difusión en agar. con discos de penicilina (10 µg/ml), clindamicina (2 µg/ml) y vancomicina (30 µg/ml), más del 50% de las cepas identificadas resultaron resistentes a tetraciclina (30 µg/ml), ampicilina (10 µg/ml), cefalotina (30 µg/ml) y sulfametoxazol-trimetoprima (23,75 µg/ml); y sensibles a gentamicina (10 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml) y ciprofloxacina (5 µg/ml). Todos los microorganismos resultaron resistentes a penicilina, el resto de los antibióticos presentaron resistencia variables con los diferentes microorganismos.

**Palabras clave:** sedimento marino, bacterias resistentes, antibióticos.

#### **ABSTRACT**

Antibiotic resistance patterns were evaluated through discriminant analysis isolates intermareal sediment. The selection of resistant bacteria was effected using liquid cultures with five antibiotics in two concentrations: imipenem (16 mg / ml, 32 µg / ml), meropenem (16 µg/ml, 32 µg/ml), gentamicin ( 8 µg/ml, 16 µg/ml), clindamycin (2 µg/ml, 4 µg/ml), and ceftazidime (32 µg/ml, 64 µg / ml). Later they were isolated and identified strains and tested for sensitivity by the agar diffusion method. Discs penicillin (10 µg/ml), clindamycin (2 µg /ml) and vancomycin (30 µg / ml), more than 50% of identified strains were resistant to tetracycline (30 µg / ml), ampicillin (10 µg / ml), cephalothin (30 µg / ml) and sulfamethoxazole-trimethoprim (23.75 µg/ml); and susceptible to gentamicin (10 µg/ml), chloramphenicol (30 µg/ml) and ciprofloxacin (5 µg/ml). All microorganisms were resistant to penicillin, other antibiotics presented variable resistance with different microorganisms.

**Keywords:** marine sediment, resistant, antibiotics.

## INTRODUCCIÓN

Los sitios costeros de las ciudades que presentan contaminación por efluentes cloacales poco tratados o sin tratamiento previo. Esta situación representa un grave problema ambiental y sanitario, ya que ocasiona disminución de la calidad sanitaria del agua y sedimento de las costas por la introducción de altos niveles de materia orgánica y bacterias entéricas patógenas al ecosistema (Vantarakis et al, 2006; Iñiguez et al, 2007; Lipp, 2001). La problemática se agrava con el uso indiscriminado de los antibióticos en prácticas médicas que contribuye a la selección y dispersión de bacterias resistentes (Butaye et al, 2001; Zambrano et al. 2002). Los centros de salud públicos o privados vierten sus aguas residuales a la red pública y se constituyen en importantes focos de contaminación biológica (Ferreira da Silva et al, 2005), debido a la presencia de bacterias con diferentes tipos de resistencia a antibióticos que pueden ser incorporados en otros microorganismos por transferencia génica (Nazaret et al, 2012). Esto representa un problema cada vez mayor para la salud pública en todo el mundo sabiendo que las bacterias ambientales juegan un papel importante en la diseminación de la resistencia antimicrobiana (Smith y Coast, 2002; Junco et al, 2006). El incremento de las resistencias de los microorganismos a los agentes antimicrobianos dificulta el tratamiento de las personas infectadas. Existe poca información sobre la existencia de cepas con resistencia a antibióticos en las playas de la ciudad de Comodoro Rivadavia (Argentina); en estudios previos se detectó la existencia de bacterias coliformes totales y fecales las cuales disminuyen su tiempo de vida en el medio ambiente marino (Pucci et al, 2013; Acuña et al, 2011), y de bacterias con resistencia a antibióticos (Muñoz et al, 2014).

El objetivo de este trabajo fue conocer si existen patrones de resistencia en bacterias aisladas en los sedimentos intermareales de la playa, km. 8, en donde existe un emisario de líquido cloacal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los sedimentos fueron extraídos de la zona norte de la ciudad correspondiente a la playa de Km.8 (45° 48' 16'' de latitud sur y 67° 24' 54'' longitud oeste). La muestra de aproximadamente 2 kg se toma de una profundidad de entre 10 a 30 cm durante la bajamar en frascos de vidrio estéril y fue procesada en el día.

### Selección y aislamiento de cepas bacterianas sencibles

*Recuento total de bacterias mesófilas:* Recuento por diseminación en superficie en medio de cultivo TSA (tripteína 17 g/L, peptona de soya 3 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 2,5 g/L, glucosa 2,5 g/L, agar 15 g/L, pH 7,3) sin antibiótico.

Se colocaron 10 frascos con 10 g de muestra de sedimento en 90 ml de caldo nutritivo (tripteína 17 g/L, peptona de soya 3 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 2,5 g/L, glucosa 2,5 g/L; pH 6,9), en botellas de 250 ml de capacidad, con los siguientes antibióticos por separado: ceftazidima (32 µg/ml; 64 µg/ml), clindamicina (2 µg/ml; 4 µg/ml), gentamicina (8 µg/ml; 16 µg/ml), imipinem (16 µg/ml; 32 µg/ml) y meropenem (16 µg/ml; 32 µg/ml) y son incubados a 25°C durante 48hs con agitación constante.

De los frascos con desarrollo positivo se realizaron asilamientos en los medios de cultivo EMB (peptona de caseína 10 g/L; lactosa 5 g/L; sacarosa 5 g/L; fosfato de potasio 2 g/L; eosina 0,4 g/L; azul de metileno 0,065 g/L; agar 1,5 g/L; pH 7,1) y TSCB (extracto de levadura 5g/L, peptona de carne 5g/L, tripteína 5 g/L, citrato de sodio 10 g/L, tiosulfato de sodio 10 g/L, bilis de buey 8 g/L, sacarosa 20 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, citrato férrico 1g/L, azul de bromotimol 0,04 g/L, azul de timol 0,04 g/L, agar 15g/L, pH 8,6), con los mismos antibióticos y concentración de los frascos de donde provenían.

### Identificación

La identificación se realizó por metil ésteres de ácidos grasos (FAME) mediante tratamiento de 40 mg de masa celular crecida en la tercera estría de un cultivo en medio tripteína soya agar glucosado TSBA (tripteína 15 g/L, peptona de soya 5 g/L, cloruro sódico 5 g/L, glucosa 5 g/L, agar 15 g/L) de 24 horas efectuando una saponificación con alcohol metílico hidróxido sódico-agua (150 mL: 45 g: 150 mL) seguida de una metilación con ácido clorhídrico 6N y alcohol metílico (325 mL: 275 mL) y a continuación una extracción con n-hexano-metil térbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10,8 g- 900 mL).

Los ácidos grasos obtenidos se determinaron como metil ésteres (FAME) por cromatografía gaseosa, utilizando una columna capilar Ultra2 de 25m de longitud y 0,2mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 serie II GC (inyección splitless; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-250°C a 5°C.min-1, 260-310°C a 40 °C.min-1, 1,5 min de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama) controlado por Chemstation 10,0x (Hewlett Packard).

### Antibiograma

La susceptibilidad de las bacterias aisladas e identificadas fue determinada por el método de difusión en disco en agar Mueller Hinton (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 1993). Se utilizaron discos de ampicilina (10 µg/ml), cefalotina (30 µg/ml), ciprofloxacina (5 µg/ml), clindamicina (2 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml), gentamicina (10 µg/ml), penicilina (10 µg/ml), sulfametoxazol-trimetoprima (23,75 µg/ml) y tetraciclina (30 µg/ml).

**Tabla 1.** Respuesta de los Enterococcus a los diferentes antibióticos.

|        |                              | PEN | CMP | CIP | TET | AMP | GEN | CC | CF | SXT |
|--------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|
| 3      | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R  | R  | R   |
| 39 a1  | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | I   | S   | S   | S   | R   | R  | R  | R   |
| 44 a   | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | S   | I   | R   | R   | R   | R  | R  | S   |
| 44 b   | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | S   | I   | S   | R   | S   | R  | I  | S   |
| 46 a   | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | I   | I   | R   | R   | R   | R  | R  | S   |
| 119 a1 | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | S   | I   | R   | R   | R   | R  | R  | S   |
| 119 a2 | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | S   | I   | R   | R   | R   | R  | R  | S   |
| 120 a  | <i>Enterococcus faecalis</i> | R   | S   | S   | R   | R   | I   | R  | R  | S   |
| 120 b  | <i>Enterococcus avium</i>    | R   | S   | S   | R   | R   | I   | R  | R  | S   |
| 108 b  | <i>Enterococcus avium</i>    | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S  | R  | S   |
| 108 a  | <i>Enterococcus faecium</i>  | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S  | R  | S   |

Penicilina 10 µg/ml (PEN), tetraciclina 30 µg/ml (TET), cloranfenicol 30 µg/ml (CMP), ciprofloxacina 5 µg/ml (CIP), ampicilina 10 µg/ml (AMP), gentamicina 10 µg/ml (GEN), clindamicina 2 µg/ml (CC), cefalotina 30 µg/ml (CF), sulfametoxazol-trimetoprima 23,75 µg/ml (SXT). Resistente (R), Resistencia Intermedia (I), Sensible (S). No identificado (N/I). Identificado por observación microscópica como levaduras (I/L).

**Tabla 2.** Respuesta de las bacterias aisladas a los diferentes antibióticos.

|       |                               | PEN | CMP | CIP | TET | AMP | GEN | CC | CF | SXT |
|-------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|
| 59    | <i>Alcaligenes faecalis</i>   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R  | S  | S   |
| 54 a  | <i>Alcaligenes faecalis</i>   | R   | I   | R   | I   | R   | S   | R  | R  | R   |
| 29 b  | <i>Bacillus sp</i>            | R   | R   | I   | I   | R   | S   | R  | R  | S   |
| 39 b2 | <i>Bacillus sp</i>            | R   | I   | S   | R   | R   | S   | R  | R  | R   |
| 63    | <i>Bacillus subtilis</i>      | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R  | R  | R   |
| 91 c  | <i>Enterobacter aerogenes</i> | R   | S   | S   | R   | S   | S   | R  | R  | S   |
| 6     | <i>Ochrobactrum anthropi</i>  | R   | S   | S   | R   | R   | S   | R  | S  | R   |
| 34 a  | <i>Salmonella typhimurium</i> | R   | S   | I   | I   | R   | R   | R  | R  | S   |
| 34 b  | <i>Salmonella typhimurium</i> | R   | S   | I   | S   | R   | S   | R  | R  | S   |
| 32 a  | <i>Salmonella typhimurium</i> | R   | S   | S   | R   | R   | R   | R  | R  | S   |
| 27 a  | <i>Yersinia-mollaretii</i>    | R   | R   | S   | S   | S   | S   | R  | S  | S   |

Penicilina 10 µg/ml (PEN), tetraciclina 30 µg/ml (TET), cloranfenicol 30 µg/ml (CMP), ciprofloxacina 5 µg/ml (CIP), ampicilina 10 µg/ml (AMP), gentamicina 10 µg/ml (GEN), clindamicina 2 µg/ml (CC), cefalotina 30 µg/ml (CF), sulfametoxazol-trimetoprima 23,75 µg/ml (SXT). Resistente (R), Resistencia Intermedia (I), Sensible (S). No identificado (N/I). Identificado por observación microscópica como levaduras (I/L).

## RESULTADOS

El recuento de bacterias mesófilas totales fue de  $1,26 \times 10^5$  UFC/gr. Se observó desarrollo bacteriano en caldos nutritivos con los diferentes antibióticos usados a pesar de las concentraciones de antibióticos añadidas al medio, así como también en medios

sólidos. Se aislaron un total de 120 cepas que luego de ser nuevamente probadas en resistencia, se seleccionaron las que presentaban resistencia a más antibióticos que fueron los mismo que se utilizaron en el aislamiento. Fueron identificadas 22 bacterias, entre las que se identificaron 8 *Enterococcus faecalis*, 2 *Enterococcus avium* y 1 *Enterococcus faecium*, los

cuales presentaron diferencia en la resistencia a los antibióticos probados (tabla 1). También se aislaron e identificaron otras bacterias que presentaron resistencia a los antibióticos probados: *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Ochrobactrum anthropi*, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia-mollaretii* (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

Los antibióticos probados poseen distintos mecanismos de acción celular y estructuras químicas. Como observaron otros autores (Vay et al, 2005, Saino et al, 1982) en nuestro estudio los antibióticos  $\beta$ -lactámicos fueron poco activos. En los últimos años los Enterococos han recibido una creciente atención por las infecciones que están produciendo (Ronconi et al, 2002) se identificaron entre las cepas 11 de este género con una resistencia del 100% a la penicilina seguido en orden decreciente por cefalotina (91%), clindamicina (82%), ampicilina (73%) y tetraciclina (64%). Se ha comunicado resistencia de tipo adquirida para los antimicrobianos antes mencionados (Silva et al, 2005; Mudryk, 2005; De la Parte-Pérez et al, 2001). La resistencia intrínseca de estas cepas se ha descrito para penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos (gentamicina y estreptomycin), entre otros (Morrison et al, 1997; Quiñónez, 2001). El 73% de las cepas probadas mostró resistencia a ampicilina esto difiere de lo informado por Baldini et al. (2008), para muestras ambientales donde no se encontraron cepas resistentes a ampicilina. Esta resistencia se relaciona con una alteración de las proteínas fijadoras de penicilina, principalmente las PBP (Rice, 2001; Ligottzi et al, 1995). Así mismo, en el 64% de las cepas estudiadas presentó resistencia a tetraciclina, esto coincide con lo informado por Junco Díaz et al. (2006) para 47 cepas del género *Enterococcus*. En las cepas estudiadas, se obtuvo un 82% de susceptibilidad a sulfametoxazol y a cloranfenicol. Resultados similares fueron obtenidos por Tejedor et al. (2001) al estudiar 19 cepas aisladas del ambiente en Las Palmas de Gran Canaria, España. Sin embargo, se identificaron cepas sensibles a este antibiótico y si bien es conocido que se trata de un género intrínsecamente resistente a este antibiótico, suele desarrollar como sensible en las pruebas de difusión en agar (Palavecino, 2001).

El hallazgo de *Salmonella typhimurium* es la causa frecuente de gastroenteritis. Aunque la mayoría de infecciones por *Salmonella* son autolimitantes (3 a 5 días), Beier et al. (2004) lo describe como el serotipo de mayor prevalencia en el ambiente y el causante del mayor número de brotes epidemiológicos por el consumo de agua y alimentos contaminados. Las cepas de *Salmonella typhimurium* presentaron resistencia a clindamicina (100%), cefalotina (100%), gentamicina. Estos resultados concuerdan con lo publicado por el Sistema de Monitoreo Nacional de Resistencia a Antimicro-

bianos de Bacterias Entéricas (NARMS, siglas en inglés) que establece que la resistencia en *Salmonella* es dependiente del serotipo y que *S. typhimurium* es el que presenta mayores niveles de resistencia (López et al., 2009). Su persistencia en el ambiente incrementa el continuo contacto con antimicrobianos y genera una selección natural que evade el ataque de éstos (Refsum et al, 2002). Los antibióticos de elección para la salmonelosis son las cefalosporinas y las quinolonas. En las cepas estudiadas se encontró una resistencia intermedia del 75% de las cepas a ciprofloxacina y susceptibilidad a sulfametoxazol (100%) y cloranfenicol (100%), esto coincide con lo informado por Miko et al, (2005), para cepas aisladas de alimentos de origen animal.

Aunque la mayoría de las especies de *Bacillus* sp. son inocuas, algunas son patógenas para las personas y los animales. Martínez et al. (2010) informan en su estudio que las cepas de *Bacillus* sp. presentan multiresistencia, esto coincide con los resultados obtenidos en el cual las cepas presentaron resistencia. En todas las cepas se observó resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Aunque suele encontrarse variación en los patrones de resistencia de las diferentes especies del género *Bacillus* sp, las mismas se consideran generalmente resistentes a las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las cefalosporinas de tercera generación, debido a la producción de un amplio espectro de  $\beta$ -lactamasas, que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico presente en todas las penicilinas y cefalosporinas (Koneman et al, 1997; Logan et al, 1999). Faria Reyes et al, (2001), asegura en su trabajo que los amiglicósidos son el grupo de antimicrobianos más efectivos contra las especies de *Bacillus* sp. esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo en el que las cepas aisladas presentaron una resistencia del 100% a gentamicina.

*Alcaligenes faecalis* corresponde al grupo de bacilos gram negativos no fermentadores y es vinculado a infecciones nosocomiales, debido a la relativa facilidad con que puede vivir esta bacteria en el ambiente, contaminando soluciones, equipos, etc. (Gardner et al, 1970). Se encontró que el mayor porcentaje de cepas fueron sensibles a gentamicina esto coincide con los resultados obtenidos por Urbina de Hernandez et al, (1978), donde informa que más del 67% de las cepas aisladas resultaron sensibles a gentamicina. Sin embargo, Nuñez et al. (2011) informan elevados porcentajes de resistencia a gentamicina para cepas aisladas de aguas grises. *Alcaligenes faecalis* posee resistencia intrínseca a  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos, por lo que se presentó mayor número de cepas resistentes a penicilina y clindamicina. Los mecanismos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en esta especie, han sido relacionados con la producción de  $\beta$ -lactamasas; incluyendo tres diferentes tipos de cefalosporinas constitutivas y al menos un tipo de penicilinasa (Fuijij et al, 1985; Gilardi, 1986). Se observaron porcentajes de resistencia intermedia a sensible para

tetraciclina esto coincide con lo hallado por Gardner et al. (1970), que informa a las tetraciclinas como la droga más efectiva, en el cual el 74% de las cepas resultaron sensibles. Pedersen et al. (1970), informa en su estudio que las cepas se muestran sensibles a varios agentes antimicrobianos, entre los cuales aparecen cloranfenicol, esto coincide con los resultados obtenidos donde se identificaron cepas de resistencia intermedia a sensible.

Los *Enterobacter* sp. poseen elementos móviles genéticos que les permiten adquirir resistencias a antibióticos, se hallan en diferentes ambientes y poseen producción de  $\beta$ -lactamasas ( Jarlier and INVS, 2014).

En el caso de *Ochrobactrum anthropi* fue sensible a algunos antibióticos, cloranfenicol, ciproxamida, gentamicina y cefalotina, en el resto fue resistente al igual que comunican otros autores (Vay et al, 2005).

*Yersinia* sp., presentan resistencia a la cefalotina y a cefazolin (Fàbrega, Vila, 2012) en nuestro caso se ensayó la cefalotina para la cual fue sensible.

## CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de altos niveles de resistencia múltiple a los antibióticos ensayados entre las cepas bacterianas estudiadas.

Todos los microorganismo resultaron resistentes a la penicilina, el resto de los antibióticos presentaron resistencias variables: tetraciclina 54,5%, cloranfenicol 18,1%, ciprofloxacina 13,6%, ampicilina 72,2%, gentamicina 36,6%, clindamicina 90,9%, cefalotina 77%, sulfametoxazol-trimetoprima 27,2%.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CEIMA y a la UNPSJB por el financiamiento del trabajo. Al personal técnico del laboratorio, Mirta Leiva y Miriam Robledo; y a las bioquímicas Adriana Muñoz y Natalia Gallegos por la lectura del manuscrito.

## BIBLIOGRAFÍA

Acuña AJ, Torres CF, Pucci GN y Pucci OH. Evaluación del tiempo de vida de bacterias potencialmente patógenas en sedimentos marinos. *Rev Soc Ven Microbiol* 2011; 31:124-129.

Anastay M, Lagier E, Blanc V, Chardon H. Epidémiologie des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital du sud de la France, 1997-2007. *Pathol Biol* 2013; 61:38-43.

Baldini M, Selzer P. Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas. *Rev Arg Microbiol* 2008; 40:48-51.

Beier RC, Pillai SD, Phillips TD, Ziprin RL. Preharvest and Postharvest Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions. 1st ed. Wiley-Blackwell 2004; 3-42.

Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Differences in Antibiotic Resistance Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Farm and Pet Animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001; 5:1374-1378.

Davin-Regli AJM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*: versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol* 2015; 6:392.

De La Parte-Pérez M, Brito A, Guzmán M, Carmona O, Gvrb. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela. Análisis de una década. *Rev Soc Ven Microbiol* 2001; 21:14-22.

Fàbrega A, Vila J. *Yersinia enterocolitica*: patogénesis, virulencia y resistencia a antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 24-32.

Faria Reyes JF, Magnasso MA, Corser PI, D'Pool G, García Urdaneta A, Valero-Leal K. Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de leche cruda. *FCV-LUZ* 2001; 6:479-484.

Ferreira Da Silva M, Tiago I, Verissimo A, Boaventura R, Nunes O, Manaia C. Antibiotic resistance in enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Eco* 2005; 45:1-8.

Frenay J, Husson MO, Gavini F, Madier S, Martra A, Izard D et al. Susceptibility to antibiotics and antiseptics of new species of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1988; 32:873-876.

Fujii T, Sato K, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of a beta-lactamase from *Alcaligenes xylosoxidans*. *Antimicrob Chemother* 1985; 16:297-298.

Gardner P, Griffin W, Swatz M, Kunz I. Nonfermentative Gram Negative Bacilli of Nosocomial Interest. *Am. J Med* 1970; 48:735.

Gilardi GL. 1985. Laboratory identification and clinical aspects. Cultural and biochemical aspects for identification of glucose-nonfermenting gram-negative rods. En: Gilardi GL (Ed), *Non fermentative gram-negative rods*. Marcel Dekker, Inc Vol 1985; 16:17-84.

Jarlier V. Surveillance of Multidrug Resistant Bacteria in French Healthcare Facilities BMR-Raisin Network Données 2012. Saint-Maurice: Institut de Veille Sanitaire 2014. Available at: <http://www.invs.sante.fr>

Junco R, Suárez M, Weng Z, Aleman S. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Hig San Ambient* 2006; 6:150-159.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WWC. The aerobic Gram positive Bacilli. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Lippincott Philadelphia, USA. 1997; 13:651-708.

Lee SH, Jeong SH, Park YM. Characterization of bla<sub>CMY-10</sub> a novel, plasmid-encoded Amp<sup>C</sup> - type  $\beta$ -lactamase gene in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes*. *J Appl Microbiol* 2003;

- 95:744–752.
- Logan N, Turnbull P. *Bacillus* and recently derived genera. ASM PRESS Manual of Clinical Microbiology 7th ed USA 1999; 23:357-369.
- Martinez AC, Cruz M, Veranes O, Carballo ME, Salgado I, Olivares S, Lima L, Rodriguez D. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Rev CENIC.* 2010; 41:1-10.
- Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:1025–1033
- Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in Enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist* 2013; 19:94–99.
- Morrison D, Woodford N, Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology* 1997; 83: 89S-99S.
- Mudryk Z. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. *Mar Poll Bull* 2005; 50:80-86.
- Muñoz AV, Pucci OH, Pucci GN. Cepas bacterianas resistentes a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, clindamicina, gentamicina, imipenem, meropenem y vancomicina, aisladas de aguas de mar en la ciudad de Comodoro Rivadavia (Argentina). *Rev Hig San Amb* 2014; 14:1253-1257.
- Nazaret G. Detección de Plásmidos en Bacilos Gram Negativos no Fermentadores Resistente a Beta-lactámicos, Provenientes del Río Manzanares; Estado Sucre. 2012.
- Nuñez L, Tornello C, Puentes N, Moretton J. Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. *Ambi Agua.* 2011; 12:3625-4212.
- Palavecino E. Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. *Rev Chil Infect* 2001; 18:95-100.
- Pedersen M, Marso E, Pickett J. Non fermentative bacilli associated with man III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am J Clin Pathol* 1970; 54:178-192.
- Pucci GN, Acuña AJ, Pucci OH. Contaminación microbiológica por enterobacterias y coliformes totales de la playa de Stela Maris, Comodoro Rivadavia, Argentina, derivada de los efluentes cloacales. *Hig San Amb* 2013; 13:1102-1107.
- Quiñones PD. Enterococos. *Microb Paras Méd* 2001; 1:179-192.
- Refsum T, Heir E, Kapperud G, Vardund T, Holstad G. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:5600-5606.
- Ronconi M, Merino LA, Fernández G. Caracterización del perfil de susceptibilidad antibiótica de cepas de *Enterococcus* aisladas de *Lactuca sativa* (lechuga). Instituto de Medicina Regional UNNE. Comunicación Científico- Tecnológica M030 2002 Sitio de Internet. Disponible en URL: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/cyt.htm>.
- Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin  $\beta$ -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22:564-570.
- Silva AJ, Loyola SP, Galleguillos OJ, Rodríguez GY, Colque Navarro P, Möllby R, Kühn I. Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev Méd Chile* 2005; 133:1201-1210.
- Smith R, Coast J. Resistencia antimicrobiana: una respuesta Global. WHO 2002; 80:126-132.
- Tejedor Junco MT, González Martín M, Pita Toledo ML, Luppiola Gómez Martín, Barrasa JL. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2001; 203:363-368.
- Vantarakis A, Venieri D, Komninou G, Papapetropoulou M. Differentiation of faecal *Escherichia coli* from humans and animals by multiple antibiotic resistant analysis. *Appl Microbiol* 2006; 42:71-77.
- Vay CA, Almuzara MN, Rodríguez CH, Pugliese ML, Lorenzo Barba F, Mattera JC, Famiglietti AMR. Actividad "in vitro" de diferentes antibacterianos sobre bacilos gram-negativos no fermentadores, excluidos *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. *Rev Arg Microb* 2005; 37:34-45.
- World Health Organization (WHO). Guidelines for safe recreational water environments. Vol.1: Coastal and Freshwaters. Geneva, Italy. 2003; 253.
- Zambrano A, Herrera N. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Rev Chil Infect* 2004; 2:117-124.