

*Nota Científica***Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique**R. Moraga¹, C. Merino¹ & M.A. Mondaca²¹Departamento de Ciencias del Mar, Universidad Arturo Prat, Casilla 121, Iquique, Chile²Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción, Casilla 162C, Concepción, Chile
cmerino@cec.unap.cl

RESUMEN. Se estudió la resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique (20°10'S-70°08'W). Se seleccionaron 43 cepas, las cuales se cultivaron en agar PCA suplementado con CuSO₄ (800 µg ml⁻¹). Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de los siguientes metales pesados: Pb, As, Ni, Cu, Hg, Zn, Cr y Cd en las cepas que presentaron crecimiento en este medio. Además, se determinaron los patrones de resistencia a estos metales así como la susceptibilidad a diferentes antibióticos. Todas las cepas analizadas fueron bacterias Gram negativas no fermentadoras, principalmente de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. Se encontraron niveles variables de resistencia a los metales pesados. Se obtuvo evidencia de una relación entre la resistencia a los metales pesados y la resistencia a los antibióticos ensayados.

Palabras claves: contaminación marina, resistencia a metales pesados, resistencia bacteriana.

Resistance to heavy metals in bacteria isolated from Iquique bay

ABSTRACT. Resistance to heavy metals in bacteria isolated from Iquique bay (20°10'S-70°08'W) was analyzed, selecting 43 strains for this study. Cultures were done in agar PCA enriched with CuSO₄ (800 µg ml⁻¹). The minimum inhibitory concentrations (MIC) to the following heavy metals: Pb, As, Ni, Cu, Hg, Zn, Cr and Cd were determined by plate diffusion. The susceptibility to several antibiotics was also established. All the strains under study were Gram negative, non-fermentative bacteria, mainly of the genus *Pseudomonas* and some of the genus *Alcaligenes*. Levels of resistance to the heavy metals were variable in different strains. Evidence of a possible relationship between the resistance to the heavy metals and the resistance to antibiotics was obtained.

Key words: marine contamination, heavy metals resistance, bacterial resistance.

La bahía de Iquique se ha caracterizado en los últimos años por presentar una gran actividad industrial en su borde costero, la mayor parte de estas industrias descargan sus residuos líquidos en ella. La presencia de un emisario submarino que descarga las aguas residuales de la ciudad, incrementa aun más la incorporación de sustancias de origen antropogénico. Estos efluentes en su conjunto, descargan una gran cantidad y variedad de contaminantes en el cuerpo receptor, desconociéndose el impacto que éstos pudiesen tener sobre las comunidades microbianas presentes en las aguas del puerto.

Se ha señalado que la presencia de metales pesados en el medio ambiente ejerce una fuerte presión de selección sobre los organismos que allí habitan (Cervantes & Vaca, 1990; Silver & Misra, 1988), un incremento en su concentración puede ejercer una presión selectiva capaz de modificar la flora microbiana (Montuelle *et al.*, 1994). Si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados, se produce una selección de aquellos genotipos que pueden sobrellevar dicho estrés (Silver & Walderharg, 1992).

La relación contaminante-microorganismo ori-

gina una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el contaminante (Montuelle *et al.*, 1994; Anisimova *et al.*, 1993). Diversos estudios para determinar el efecto sobre la flora bacteriana se han realizado en ecosistemas impactados por estos contaminantes, observándose que la resistencia bacteriana a metales suele estar asociada con la resistencia a antibióticos, como es el caso de la resistencia al mercurio (Barkey & Olson, 1986; Timoney *et al.*, 1982).

La contaminación por metales en los bordes costeros y su incidencia sobre la flora microbiana acuática no han sido profusamente estudiadas en aguas chilenas, razón por la cual se ha considerado importante estudiar la presencia de bacterias en aguas de la bahía de Iquique, que puedan presentar resistencia a contaminantes metálicos. Para lo cual se colectaron muestras de agua en la bahía de Iquique (20°10'S-70°08'W), en estaciones cercanas a la descarga del emisario submarino y de los efluentes industriales (Fig. 1). Las muestras se obtuvieron en superficie con botellas hidrográficas Niskin, se almacenaron en botellas de vidrio estériles y se refrigeraron para su posterior análisis.

De cada muestra se sembraron 0,1 ml en diluciones apropiadas, por diseminación en superficie en placas con agar R2A y agar ENDO-C, las cuales se incubaron por cinco días a temperatura ambiente (20°C). Las colonias desarrolladas se caracterizaron de acuerdo a sus características morfológicas. Se seleccionaron 43 colonias al azar y se traspasaron a placas de agar PCA enriquecido con 800 µg·ml⁻¹ de CuSO₄. Las colonias desarrolladas se identificaron mediante las siguientes pruebas bioquímicas: TSI, LIA, Citrato de Simmon, Urea, SIM, OF. Las bacterias no fermentadoras se identificaron mediante el Kit EM-Ident NF (Merck).

Se ensayó la resistencia a los siguientes metales: As (NaAsO₄H*7H₂O), Cd (CdCl₂), Cr (K₂Cr₂O₇), Cu (CuSO₄), Hg (HgCl₂), Ni (NiSO₄), Pb (Pb(NO₃)₂), Zn (ZnCl₂) y se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para estos metales (Anisimova *et al.*, 1993). Las concentraciones ensayadas fueron para As, Cu, Ni, Pb de 3.200, 1.600, 800, 400, 200 µg·ml⁻¹; para Cr y Zn de 1.600, 800, 400, 200, 100 µg·ml⁻¹; para Cd de 400, 200, 100, 50, 25 µg·ml⁻¹ y para el Hg de 40, 20, 10, 5, 2,5 µg ml⁻¹ de acuerdo a Márquez *et al.* (1979) y Mondaca *et al.* (1993). Los ensayos se realizaron

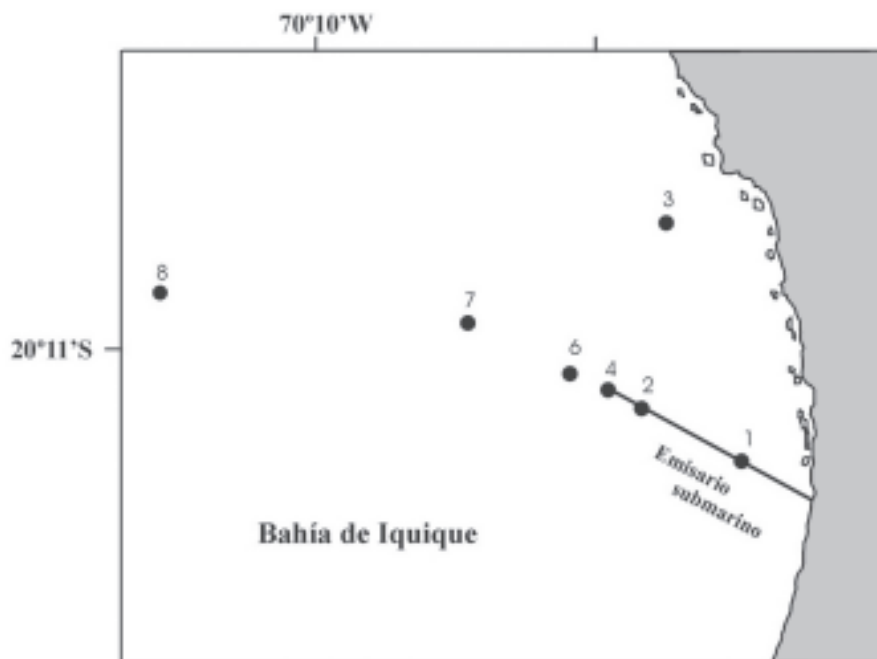


Figura 1. Sitios de muestreo en la bahía de Iquique. La línea segmentada indica la posición del emisario y los números las estaciones analizadas.

Figure 1. Sampling sites in Iquique Bay. Segmented line indicates position of the emissary and the numbers indicate the analyzed stations.

en agar PCA suplementado con el metal. Las placas se sembraron con un replicador Steel y se incubaron por 48 h.

La resistencia a antibióticos se estudió mediante la técnica de difusión en placa (NCCLS, 1993). Los antibióticos utilizados fueron: ácido nalidixico (AN) 30 mg, nitrofurantoina (N) 300 mg, cefataxima (Ctx) 30 mg, cloramfenicol (C) 30 mg, tetraciclina (T) 30 mg, gentamicina (G) 10 mg, cefamox (Cfx) 30 mg, ampicilina (A) 10 mg, sulfatrimet (S) 25 mg y amikacin (Ak) 30 mg.

Los recuentos bacterianos fueron del orden de las 10^4 UFC·ml⁻¹, de los cuales la mayor fracción correspondió a bacilos Gram negativos (Tabla 1). Las estaciones 4 y 7 presentaron las mayores concentraciones de bacterias, y estuvieron ubicadas sobre y cercanas al tubo del emisario respectivamente. A su vez, los menores recuentos se obtuvieron en la estación 8 ($0,6 \cdot 10^4$ UFC ml⁻¹), ubicada fuera de la bahía, alejada del punto de descarga del emisario.

Esta diferencia en los recuentos obtenidos puede ser explicada por la posición geográfica de las estaciones respecto a la boca del emisario, como también por los procesos propios de autodepuración del mar y de dilución, los cuales serían más efectivos en las estaciones más alejadas de la boca del emisario (Mitchell, 1972; Shaw & Cabelli, 1980; Bell *et al.*, 1983).

De las 43 cepas seleccionadas en este estudio, sólo el 27% creció en el medio suplementado con cobre. La mayor parte de estas cepas correspondieron a bacterias no fermentadoras, Gram negativas pertenecientes al género *Pseudomonas*, principalmente *P. maltophilia*, y algunas correspondientes al género *Alcaligenes*.

La CMI de las cepas estudiadas demostró que los niveles de resistencia hacia los metales pesados ensayados fueron diferentes para cada

cepa (Tabla 2). Estos resultados sugieren la presencia de determinantes genéticos en las células bacterianas que estarían confiriendo esta capacidad de resistencia, tal como se ha detectado la presencia de ADN extracromosomal en cepas resistentes a metales aisladas en aguas del río Bío-Bío (Mondaca *et al.*, 1993).

De las cepas estudiadas, el 100% fue resistente al Pb y As, el 77,7% al Cu y el 36,4% al Ni. Se establecieron patrones de resistencia, los cuales pueden ser clasificados en cuatro biotipos principales (Fig. 2). Se determinó que las cepas resistentes presentaban simultáneamente resistencia a dos metales, y tres de estas cepas fueron resistentes a cuatro metales. El patrón de resistencia que mayor frecuencia de ocurrencia presentó fue: Pb-As-Cu, con un 45,5%.

Se observó que todas las cepas analizadas presentaron multiresistencia (*i. e.* resistencia a cuatro o más antibióticos al mismo tiempo), frente a los antibióticos ensayados (Fig. 3). El patrón que presentó una mayor frecuencia (50%) fue N-Ctx-Cfx-Ak-A. Los mayores porcentajes de resistencia se obtuvieron para los siguientes antibióticos: ampicilina, amikacina, cefomax, cefotaxima y nitrofurantoina, con un 90,9%; 72,7%; 90,9%; 81,8% y 90,9%, respectivamente.

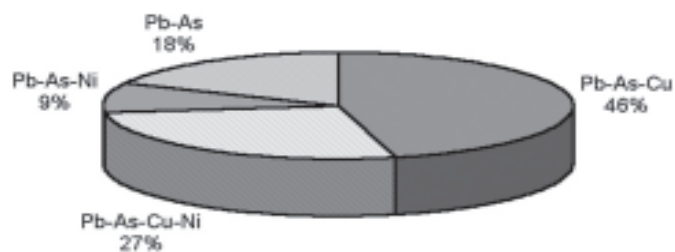


Figura 2. Patrones de resistencia observados en las cepas analizadas de acuerdo a los metales ensayados. Se incluyen los porcentajes de ocurrencia de dichos patrones en el total de las cepas ensayadas.

Figure 2. Resistance patterns observed in strains analyzed according to metals assay. The percentages of occurrence of these patterns in the total of the assay strains are included.

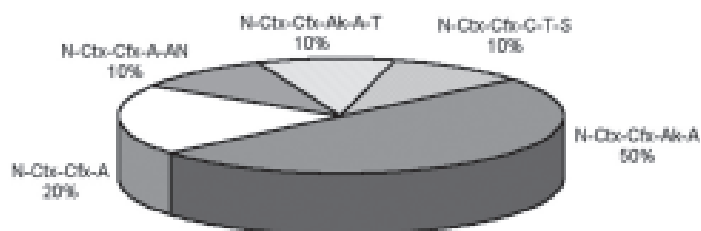


Figura 3. Frecuencia de resistencia a los diferentes antibióticos ensayados.

Figure 3. Resistance frequency to the different antibiotics assayed.

Los resultados obtenidos muestran evidencias de la existencia de una vinculación entre la resistencia a metales pesados y la resistencia a antibióticos en las cepas aisladas. Se detectó que esta relación fue superior a un 50% para Pb, As, Cu y Ni con los antibióticos N, Ctx, Cfx, Ak y A. Para el caso del Cu y Ni se observó una ocurrencia conjunta específica con los siguientes antibióticos: N, Cfx, A.

La presencia de bacterias entéricas en el área de estudio por efecto de la descarga de aguas servidas posibilita la ocurrencia de un intercambio génico entre éstas y la comunidad bacteriana autóctona, mediante la transferencia horizontal de determinantes de resistencia, *i. e.* plasmidios. Lo cual puede dar respuesta a esta relación de resistencia conjunta hacia metales pesados y antibióticos detectadas en las bacterias aisladas en este estudio.

Tabla 1. Recuentos de bacterias viables obtenidas en las estaciones ubicadas en la bahía de Iquique.

Table 1. Recounts of viable bacterias obtained from stations located in Iquique Bay.

Estación	Recuento Total UFC·10 ⁴	Recuento Gram (-) UFC·10 ⁴
1	4,4	0,8
2	6,2	1,7
3	4,0	1,6
4	11,7	2,9
5	2,7	1,5
6	2,0	0,5
7	16,2	1,4
8	0,6	0,6

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias para las cepas aisladas de la bahía de Iquique ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Table 2. Minimum inhibitory concentrations for strains isolated in Iquique Bay ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Género	Cepa	Metal ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)							
		Pb	As	Hg	Zn	Cd	Ni	Cr	Cu
<i>Pseudomonas</i>	G- 2R1	>3.200	>3.200	10	200	50	800	200	1.600
	G-15R3	>3.200	>3.200	5	800	100	3.200	400	3.200
	G-21R6	>3.200	>3.200	5	200	50	1.600	400	3.200
	RT- 1R5	>3.200	>3.200	<2,5	200	50	800	100	1.600
	RT-5R5	>3.200	>3.200	10	800	50	400	200	1.600
	RT- 7S5	>3.200	>3.200	5	200	100	800	200	800
	RT- 8R5	>3.200	>3.200	<2,5	200	100	200	400	1.600
	RT- 9R5	>3.200	>3.200	<2,5	400	200	3.200	200	1.600
<i>Alcaligenes</i>	G- 9R3	>3.200	>3.200	<2,5	200	50	800	400	1.600
	G-10S3	>3.200	>3.200	10	400	200	800	200	800
	RT-6S5	>3.200	>3.200	5	200	50	160	200	800

REFERENCIAS

- Anisimova L., T. Siunova & A. Boronin. 1993.** Resistance to metals gram negative bacteria isolated from sewage and soils of industrial regions. *Microbiology*, 62(5): 505-508.
- Bell J., G. Elliot & D. Smith. 1983.** Influence of sewage treatment and urbanization and selection of multiple resistance in fecal coliform populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(1): 227-232.
- Barkey, T & B. Olson. 1986.** Adaptation of aquatic microbial communities to Hg²⁺ stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(1): 170-175.
- Cervantes, C. & S. Vaca. 1990.** Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos. *Ciencia y Desarrollo*, 17(102): 86-96.
- Márquez, A., F. Congregado & D. Simon-Pujol. 1979.** Antibiotic and heavy metals resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *J. Appl. Bacteriol.*, 47: 347-350.
- Mitchell, R. 1972.** Ecological control of microbial imbalances. En: R. Mitchell (ed.). *Water pollution microbiology*. Wiley-Interscience, New York, 576 pp.

- Mondaca, M., M. Abarzúa, K. Paredes, T. Maugeri & M. Martínez. 1993.** Transferencia de resistencia a metales pesados en bacterias aisladas del río Bío Bío, VII Región, Chile. *Rev. Latinamer. Microbiol.*, 35: 39-43.
- Montuelle, B., X. Latour, B. Volat & A. Gounet. 1994.** Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53: 753-758.
- National Committee For Clinical Laboratory Standard (NCCLS). 1993.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. NCCLS, Wayne, PA M7-A2, 13(25): 1-18.
- Timoney, T., J. Part, J. Giles & J. Spanier. 1982.** Heavy metals and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(3): 465-472.
- Shaw, D. & M.V. Cabelli. 1980.** R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and fecal strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40(4): 756-764.
- Silver, S. & T. Misra. 1988.** Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Ann. Rev. Microbiol.*, 53: 2725-2732.
- Silver, S. & M. Walderharg. 1992.** Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 56(1): 195-228.

Recibido: 16 octubre 2001; Aceptado: 21 abril 2003