

Niveles de tolerancia a cobre (Cu^{+2}) en vibrionáceas asociadas al bivalvo *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)

Tolerance levels to copper (Cu^{+2}) in vibriónaceas associated to *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)

Milko Jorquera¹, Andrés Camaño², María Angélica Mondaca³ y Carlos Riquelme¹

¹Laboratorio de Microbiología Marina, Departamento de Acuicultura, Universidad de Antofagasta. Casilla 170, Antofagasta.

²Gerencia de Medio Ambiente, Minería Escondida Ltda. Casilla 690, Antofagasta.

³Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Casilla 20-C, Concepción. criquelme@uantof.cl

Abstract. The effect of Cu^{+2} on vibriónaceas associated to the bivalve *Argopecten purpuratus* has been studied. *A. purpuratus* specimens were exposed to 20 and 40 $\mu\text{g Cu}^{+2}/\text{l}$ under culture conditions. Bacteriological analysis and quantitative determination of Cu^{+2} in gill, digestive gland and kidney were carried out. Later, Cu^{+2} tolerant vibriónaceas were isolated to determine their tolerance to several heavy metals (e.g. Cu, Cr, Zn, Cd and Hg) and resistance to antibacterials. Besides, plasmids presence in multiresistant strains were determined. The results showed the following: i) total count of heterotrophic bacteria in treatments with and without addition of Cu^{+2} did not show quantitative differences; ii) a natural association was found in gill and digestive gland with Cu^{+2} tolerant vibriónaceas, which fluctuated between 20% and 40% of the total vibriónaceas; iii) organisms exposed to Cu^{+2} showed a significant increase of tolerant vibriónaceas in kidneys and digestive glands throughout the experiment; iv) the kidney showed to be an effective bioaccumulator of Cu^{+2} ; v) Cu^{+2} tolerant vibriónaceas showed a high tolerance to metals (Zn, Cr, Cd) and antibacterials; vi) presence of plasmids in Cu^{+2} tolerant vibriónaceas was confirmed.

Keywords: *Argopecten purpuratus*, heavy metals, copper, antibacterial resistance, plasmids, Chile.

Resumen. Se estudió el efecto de Cu^{+2} en vibrionáceas asociadas a *Argopecten purpuratus* (ostión del Norte). Especímenes de *A. purpuratus* fueron expuestos a 20 y 40 $\mu\text{g Cu}^{+2}/\text{l}$ en condiciones de cultivo. Se realizaron análisis bacteriológicos y de contenido de Cu^{+2} en branquia, glándula digestiva y riñón. Posteriormente, se aislaron vibrionáceas tolerantes a Cu^{+2} , determinando su tolerancia a diversos metales pesados (e.g. Cu, Cr, Zn, Cd y Hg) y resistencia a antibacterianos. Además, se determinó la presencia de plasmidos en vibrionáceas multiresistentes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: i) no se observó diferencias cuantitativas de bacterias heterotróficas totales en organismos con y sin adición de Cu^{+2} ; ii) se encontró asociación en forma natural, en branquia y glándula digestiva, de vibrionáceas tolerantes a Cu^{+2} , oscilando entre un 20% a 40% de las vibrionáceas totales; iii) en organismos expuestos a Cu^{+2} se observó un incremento significativo de vibrionáceas tolerantes en riñón y glándula digestiva durante el experimento; iv) se determinó que el riñón, en *A. purpuratus*, es claramente un órgano bioindicador medido como concentración de Cu^{+2} en tejido; v) se encontró que vibrionáceas tolerantes a Cu^{+2} presentan una alta tolerancia a metales (Zn, Cr y Cd) y antibacterianos; vi) se evidenció la presencia de plasmidos en vibrionáceas tolerantes a Cu^{+2} .

Palabras claves: *Argopecten purpuratus*, metales pesados, cobre, resistencia antibacteriana, plasmidos, Chile.

Introducción

Los bivalvos, al igual que otros organismos acuáticos, toman los metales del medio ambiente que los rodea, teniendo como principal ruta de ingreso las branquias y superficies epiteliales (Strømgren & Nielsen 1991). Los metales pueden interactuar con la célula, pudiendo ser absorbidos y acumulados como resultado de mecanismos físico-químicos y de sistemas de transportes específicos (Gadd 1992).

En el caso particular de los microorganismos, los metales están directa o indirectamente involucrados en todos los aspectos de su crecimiento. Existiendo algunos catalogados como esenciales, tales como Mn, Fe, Co,

Ni, Cu, Zn, y Mo. La esencialidad de los metales se debe a diversas funciones que cumplen los iones dentro de la célula microbiana (Gadd op cit.).

En bivalvos, se ha determinado la participación de la microflora asociada a procesos digestivos a través de la producción de enzimas extracelulares, proveniendo al organismo de factores indispensables para su crecimiento (Prieur *et al.* 1990, Nicolas *et al.* 1990 Douillet & Langdon 1994). Moriarty (1990), define la existencia de dos tipos de microflora en organismos marinos: a) la asociada o residente que corresponde a aquella que es estable en el organismo, dentro de la cual está bien documentada la presencia de vibrios (Colwell 1984) y b)

la transitoria que corresponde a la microflora que sólo está de paso por el organismo.

El cobre es un metal de transición esencial para los organismos, que puede formar complejos con compuestos orgánicos y participar como componente catalítico de enzimas y proteínas (Final Report Project ICA N°223, 1996). Producto de fenómenos naturales y del aumento de la actividad industrial este metal se encuentra presente en zonas costeras del norte chileno (Hernandez 1998, Salamanca 1998).

Si bien existen numerosos estudios sobre el efecto de diversos metales en la tolerancia de las poblaciones microbianas (Duxbury & Bicknell 1983, Gadd 1992, Fitch *et al.* 1993, Gordon *et al.* 1993, Cooksey 1993, Silver & Phung 1996) y de los determinantes genéticos de dicha tolerancia (Dressler *et al.* 1991, Mondaca *et al.* 1993, Cooksey 1990, 1994, Cervantes & Silver 1996), no existen antecedentes sobre el efecto de metales en el equilibrio y la dinámica de la microflora asociada a los moluscos bivalvos. En el presente estudio se investigó los niveles de tolerancia a metales y antibacterianos de vibronáceas asociadas al molusco bivalvo *Argopecten purpuratus* expuesto experimentalmente a diferentes concentraciones de cobre.

Materiales y Métodos

Obtención de especímenes y diseño experimental

Doscientos treinta ejemplares de *Argopecten purpuratus* (ostión del norte) de talla igual o superior a 60 mm de altura valvar, fueron extraídos mediante buceo autónomo desde el banco natural ubicado en la bahía de Mejillones del Sur (23°00'S 70°25'O).

Los ejemplares se distribuyeron en bandejas plásticas (40x40x10 cm) dejando 15 ostiones por bandeja. Cada set de tres bandejas fue dispuesto en un estanque de 200 l de fibra de vidrio con agua de mar filtrada a 0,45 µm (Cuno cartridge) y aireación constante (Fig. 1). La alimentación de los ostiones se realizó 4 horas antes de realizar el cambio diario de agua y consistió en una mezcla de microalgas (7:3 de *Isochrysis galbana* clon T-Iso y *Chaetoceros* sp., respectivamente), obteniendo una concentración final en los estanques de cultivo de 10⁴ células/ml. Los tratamientos consistieron en concentraciones de Cu²⁺ de 20 y 40 µg/l (en duplicado), además de un control sin el metal. Se realizaron monitoreos periódicos de temperatura, oxígeno y pH.

Análisis bacteriológicos y de contenido de cobre en tejidos

Se realizaron muestreos en los días 0, 15, 30 y 45. En cada uno, se tomaron 20 organismos de cada

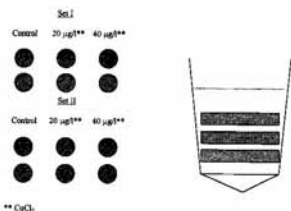


Figura 1

Esquema de la distribución de los estanques y disposición de las bandejas dentro de cada uno.

Diagram of tanks distribution and disposition of the boxes inside each one.

Estanque/tank Bandeja/box

tratamiento, 10 se utilizaron para los análisis bacteriológicos y 10 para análisis de contenido de Cu²⁺ en los tejidos.

Para el análisis bacteriológico, se realizó la disección de los organismos con el fin de separar branquias, glándula digestiva y riñón. Estas muestras se sembraron en diluciones seriadas sobre placas con agar marino (DIFCO) y fueron incubadas por una semana a 20°C. Además, se sembraron muestras de agua de mar de entrada a los estanques y muestras de alimento (microalgas). Posterior a la incubación de las placas y con la ayuda de un Replica Plater (SIGMA), se procedió a replicar en los siguientes medios: agar TCBS (agar-tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa) (OXOID), para determinar vibronáceas totales y agar TCBS suplementado con 150 mg Cu²⁺/l (CuCl₂) (Titrisol, MERCK), para determinar el porcentaje de vibronáceas tolerantes a Cu²⁺. Una vez realizadas las réplicas, las placas fueron incubadas por 48 horas a 20°C.

El análisis de contenido de cobre en tejidos, se realizó mediante potenciometría de redisolución de iones computarizada (PSA) (Roman & Rivera 1995) en muestras de branquias, glándulas digestivas, riñón, alimento y agua de mar de entrada al sistema de cultivo.

Determinación de tolerancia a metales pesados y susceptibilidad a diferentes antibacterianos

Para la determinación de tolerancia a metales pesados y susceptibilidad a antibacterianos se seleccionaron 92 vibronáceas tolerantes a 150 mg Cu²⁺/l en agar TCBS suplementado con 2% NaCl. Pruebas preliminares utilizando siete vibronáceas tomadas al azar permitieron definir como mejor sustrato el agar triptona soya (TSA)(MERCK) suplementado con 2%

NaCl. Al utilizar este medio se observó una mayor susceptibilidad de las cepas a los agentes utilizados que las observadas en el agar Mueller-Hinton (Oxoid) suplementado con 2% NaCl y en el agar nutritivo (Difco) suplementado con 2% NaCl.

Las cepas seleccionadas se sembraron en caldo nutritivo (CN) (DIFCO) suplementado con 2% de NaCl y se incubaron durante la noche a 20°C. Cada una de las cepas ensayadas fueron diluidas en solución salina marina (SSM) (Austin 1988) y sembradas en placas de TSA suplementado con 2% NaCl y los siguientes metales: cobre ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), cromo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), zinc ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), cadmio ($\text{CdCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) y mercurio (HgCl_2), respectivamente. Las concentraciones de cada uno de los metales variaron entre 0,5 a 10 mM. Luego, las placas se incubaron por 48 h a 20°C. Se consideró como cepa tolerante, la que presentó crecimiento en valores sobre los 0,5 mM de cada metal. Además se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada uno.

Para determinar la resistencia a diferentes antibacterianos de las cepas previamente seleccionadas, se inocularon tubos de CN suplementado con 2% de NaCl con cada una de las cepas. Los cultivos se incubaron durante la noche a 20°C. Posteriormente, se transfirieron alícuotas de cultivos a tubos de SSM hasta obtener una turbidez 0,5 Mc Farland. La susceptibilidad se determinó de acuerdo al método de difusión de discos (Barry & Thornsberry 1991). Se ensayaron los siguientes antibacterianos: ampicilina (10 µg), cefotaxima (30 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg), ácido nalidixico (30 µg) y ciprofloxacina (5 µg). Las placas se incubaron por 24-48 h a 20°C y posteriormente se procedió a medir los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Determinación de la presencia de plásmidos y localización de cobre en la célula bacteriana

La extracción de plásmidos se realizó de acuerdo al método de Kado & Liu (1981) modificado por Rochelle et al. (1986) los cuales fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (0,8%). La presencia de plásmidos se observó en un transiluminador UV después de teñir los geles con bromuro de etidio.

Posteriormente, siete cepas seleccionadas (MM1, MM2, M9, M13, M15, M16 y M26) de acuerdo a su patrón de tolerancia a metales y multiresistencia a antibacterianos se sembraron en CN suplementado con 2% NaCl y 0,5 mM de Cu^{+2} . Los caldos se incubaron durante la noche a 20°C, un volumen de 1,5 ml se centrifugó a 7.000 rpm por 5 min. El pellet se lavó dos

veces con suero fisiológico (0,8% NaCl) y se resuspendió en 400 µl del mismo suero. Las muestras se procesaron para microscopía de transmisión electrónica (MTE) de acuerdo a la metodología descrita por Macaskie et al. (1987) y se observaron en un microscopio electrónico SEM (ETEC Company, autoscán).

Resultados

Durante el desarrollo de las experiencias, se observó un incremento en la carga de bacterias heterotróficas totales en branquias y glándula digestiva, tanto en los organismos con y sin exposición a Cu^{+2} (Figs. 2, a y b). En cambio, en el riñón no se observó un patrón definido en las concentraciones bacterianas (Fig. 2c).

En la Figura 3 se muestran los porcentajes de vibrionáceas. Se puede observar que a través del tiempo hay un aumento en el porcentaje de vibrionáceas en branquias y glándula digestiva (Fig. 3, a y b); en el riñón no se observa un patrón definido. Al observar los porcentajes de vibrionáceas tolerantes a Cu^{+2} en branquias (Fig. 4a), éstos revelaron un constante incremento durante el transcurso de la experiencia, independiente de la presencia de Cu^{+2} en los estanques de cultivo. En la glándula digestiva se detectó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de vibrionáceas tolerantes en los organismos expuestos a Cu^{+2} después de 30 días de experimentación. Además, se observó la existencia en forma natural (tiempo 0) de un 20% a 40% de vibrionáceas tolerantes a Cu^{+2} en branquia y glándula digestiva, respecto a la población de vibrionáceas totales. En riñón (Fig. 4c), no se apreció un efecto claro causado por la presencia de Cu^{+2} sobre la flora bacteriana de los moluscos. Es interesante señalar que en este órgano, durante los primeros 15 días de experimentación no se detectó la presencia de vibrionáceas tolerantes al metal, excepto en los organismos sometidos a la presencia de Cu^{+2} donde se obtuvieron valores sobre el 60% de bacterias tolerantes.

En cuanto al efecto de la exposición de los ostiones al Cu^{+2} durante 45 días, éstos presentaron una tasa de mortalidad de 0,04 individuos/día para los controles, 0,18 individuos/día para individuos expuestos a 20 µg Cu^{+2}/l y 0,48 individuos/día para individuos expuestos a 40 µg Cu^{+2}/l .

En las bacterias asociadas al alimento (microalgas) no se detectó la presencia de vibrionáceas, en cambio en el agua de mar de entrada a los estanques se obtuvo un $11,2 \pm 0,43\%$ de vibrionáceas respecto de la concentración de bacterias heterotróficas totales, de las cuales el 92,86 \pm 7,14% presentaron tolerancia a 150 mg Cu^{+2}/l . Los análisis químicos de las muestras

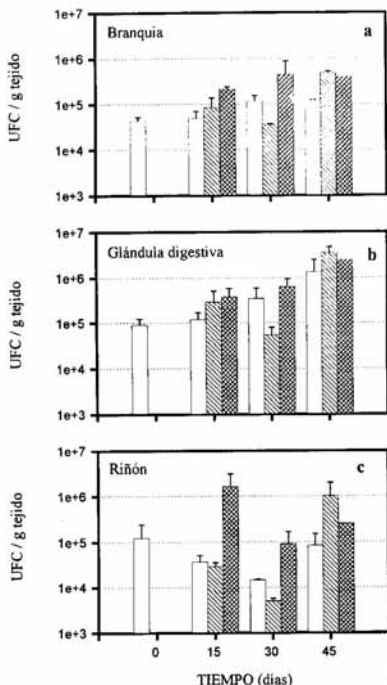


Figura 2

Recuento de bacterias heterotróficas totales, en agar marino, expresado como promedio de tres determinaciones. UFC=unidades formadoras de colonias.

Total count of heterotrophic bacteria, on marine agar, expressed as average of three determinations. UFC=colony-forming unit.

demonstraron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en glándula digestiva después de 30 y 45 días, y en riñón durante toda la experiencia (Figs. 5, b y c). Esta bioacumulación de Cu^{+2} se observó marcadamente en riñón (Fig. 5c), llegando a detectarse valores superiores en 25 veces para organismos expuestos a 20

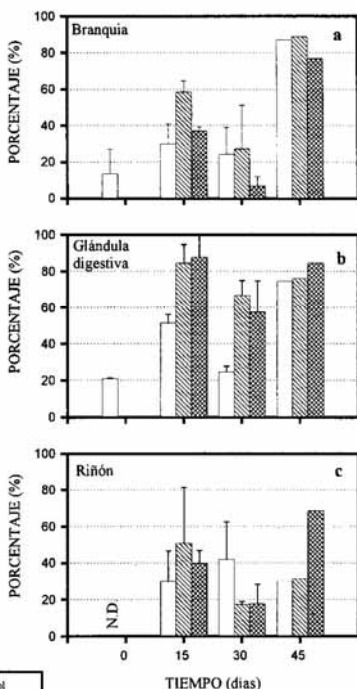


Figura 3

Porcentaje de vibriónaceas con respecto al total de bacterias heterotróficas. N.D.= no detectado.

Percentage of vibriónaceas respect to total heterotrophic bacteria. N.D.= not detected.

$\mu\text{g Cu}^{+2}/\text{l}$ y 32 veces para $40 \mu\text{g Cu}^{+2}/\text{l}$, respecto a los controles después de 45 días.

Los análisis de muestras de agua de mar de los estanques arrojaron un resultado promedio de contenido de Cu^{+2} disuelto de $1,77 \pm 0,405 \mu\text{g}/\text{l}$, mientras que el alimento microalgal presentó un promedio de $21,153 \pm 8,217 \mu\text{g Cu}^{+2}/\text{l}$, representando un aumento real de concentración en los estanques de $0,053 \pm 0,02 \mu\text{g}$

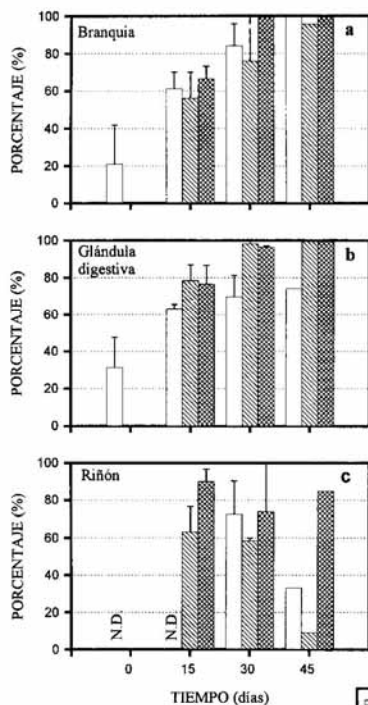


Figura 4

Porcentaje de vibriónaceas tolerantes a 150 µg Cu²⁺/l. N.D.=no detectado.

Percentage of tolerant vibriónaceae to 150 µg Cu²⁺/l. N.D.=not detected.

Cu²⁺/l. Por lo tanto, la concentración de Cu²⁺ en los estanques aportada por el agua de mar más el alimento correspondió aproximadamente a 1,82 ± 0,43 µg Cu²⁺/l. Los valores promedio de los factores abióticos durante el transcurso de la experiencia fueron los siguientes: temperatura = 22, 5 ± 0,5 °C; oxígeno disuelto = 7,6 ± 0,8 mg/l; pH = 7,63 ± 0,08.

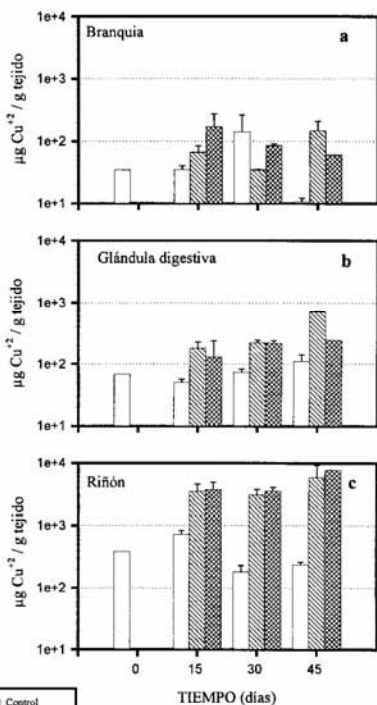


Figura 5

Acumulación de Cu²⁺ en diferentes tejidos expresados como promedio de tres determinaciones.

Accumulation of Cu²⁺ in different tissues expressed as average of three determinations.

En cuanto a la determinación de tolerancia a Cu²⁺ y otros metales, el 100% de las cepas presentaron tolerancia a cobre, zinc y cadmio; y un 80,43 % tolerancia a cromo (Tabla 1). Por el contrario, todas las cepas ensayadas fueron sensibles a mercurio (CMI menor o igual a 0,5 mM). Los valores de CMI se muestran en la Tabla 2; en ella se observa un gran porcentaje de bacterias tolerantes a altas concentraciones de zinc, cobre y cadmio.

La susceptibilidad a antibacterianos de las 92 cepas ensayadas se muestra en la Tabla 3. Se observa que la mayoría de los antibacterianos testeados inhibió el crecimiento. En cuanto a la resistencia de las cepas seleccionadas (Tabla 4) un 98,92 % presentó resistencia a más de un antibacteriano, encontrándose el mayor porcentaje de multiresistencia (70,65%) al patrón amikacina, gentamicina y ampicilina, simultáneamente. La extracción de plásmidos evidenció la presencia de bandas plasmidiales en las 20 cepas ensayadas, observándose a lo menos dos bandas plasmidiales en cada cepa. No se observaron bandas en la cepa sensible a Cu^{+2} usada como control.

Los estudios de microscopía electrónica de las siete vibrionáceas tolerantes incubadas con adición de Cu^{+2} , revelaron la presencia de zonas densas oscuras y

depósitos de gránulos intracelulares (Figs. 6, a y b), los cuales no fueron observados cuando las cepas ensayadas fueron incubadas en ausencia de adición de Cu^{+2} (Fig. 6c).

Discusión

El aumento en la carga de bacterias heterotróficas totales en los ostiones, puede explicarse de acuerdo a lo descrito por Prieur *et al.* (1990), quien señala que sistemas de cultivo de moluscos bivalvos, presentan características apropiadas para la proliferación de microorganismos, debido al enriquecimiento de nutrientes por alimentación y la baja tasa de renovación de agua (24-48 h). Además, en el presente experimento se utilizó agua de mar filtrada a 0,45 μm , lo cual elimina la presencia en los estanques de predadores

Tabla 1

Tolerancia de 92 vibrionáceas a 0,5 mM de diversos metales ensayados.

Tolerance to 0,5 mM of 92 vibronaceae to several metals tested.

Metal	Nº cepas tolerantes	Porcentaje %
Cobre	92	100
Cromo	74	80,43
Zinc	92	100
Cadmio	92	100
Mercurio	0	0

Tabla 3

Resistencia a antibacterianos de las 92 vibrionáceas ensayadas.

Resistance to antibacterial of the 92 vibronaceae tested.

Antibacteriano	Nº cepas resistentes	Porcentaje %
Ampicilina	76	82,61
Cefotaxima	0	0
Gentamicina	91	98,91
Amikacina	92	100
Cloranfenicol	0	0
Tetraciclina	0	0
Sulfametoxazol-trimetoprim	1	1,08
Acido nalidixico	0	0
Ciprofloxacina	10	10,87

Tabla 2

Concentración mínima inhibitoria (CMI) y porcentaje de tolerancia a los diferentes metales de las 92 vibrionáceas.

Minimum inhibitory concentration (MIC) and percentage of tolerance to the different metals of the 92 vibronaceae.

CMI (mM)	Metal (porcentaje cepas tolerantes)
8	Zinc (93,48%)
4	Cobre (100%), Zinc (6,52%) y Cadmio (95,65%)
2	Cadmio (4,35%) y Cromo (1,08%)
1	Cromo (79,35%)
0,5	Cromo (19,57%) y Mercurio (0%)

Tabla 4

Patrón de resistencia a antibacterianos de las 92 vibrionáceas ensayadas.

Resistance pattern to antibacterial of the 92 vibronaceae tested.

Patrón resistencia	Nº cepas resistentes	Porcentaje %
Amikacina	1	1,08
Amikacina y gentamicina	15	16,30
Amikacina, gentamicina y ampicilina	65	70,65
Amikacina, gentamicina, ampicilina y ciprofloxacina	10	10,87
Amikacina, gentamicina, ampicilina y sulfametoxazol-trimetoprim	1	1,08

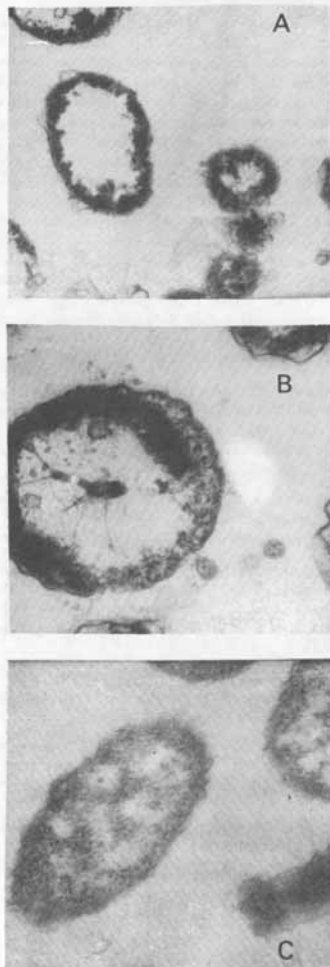


Figura 6

Bacterias incubadas en presencia (A y B) y ausencia de cobre (C). Flechas=zonas densas y oscuras intracelulares.

Bacteria incubated in presence (A and B) and absence of copper (C). Arrows= dense and dark zones into cells.

naturales de bacterias, como son los protozoos y microflagelados.

En organismos expuestos a Cu^{+2} se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en riñón (día 15) y glándula digestiva (día 15 a 45), de vibronáceas tolerantes a Cu^{+2} (150 mg/l), este cambio en la población de vibronáceas puede responder a la exposición prolongada del metal sobre poblaciones bacterianas y la acumulación de Cu^{+2} en los tejidos, ya que este metal podría haber seleccionado la población bacteriana de acuerdo a su eventual toxicidad (Bordin et al. 1992), reduciendo la diversidad de microorganismos e incrementando la capacidad de tolerancia, dando como resultado la selección de poblaciones tolerantes (Gadd 1992, Final Report Project ICA N°223, 1996).

La presencia de vibronáceas tolerantes a Cu^{+2} en branquia y glándula digestiva al inicio del experimento, reveló la presencia en forma natural de microorganismos tolerantes a Cu^{+2} en la microflora de *A. purpuratus*. Este hecho puede atribuirse a la existencia de vetas metalogénicas en la región, las cuales aportan metales al ecosistema costero a través de fenómenos como lluvias, aluviones y ríos subterráneos. En tanto, la presencia e incremento de vibronáceas tolerantes al Cu^{+2} en los controles durante el transcurso del experimento, puede explicarse debido al constante ingreso al sistema de cultivo de vibrios tolerantes a Cu^{+2} , como revelaron los resultados obtenidos al analizar el agua de mar de entrada.

En cuanto a la alta acumulación de Cu^{+2} en el riñón en comparación a los otros tejidos (branquia y glándula digestiva), existen antecedentes que este órgano es capaz de acumular varias sustancias, entre ellas metales, los cuales pueden tomar formas de agregados y gránulos dentro del tejido (Shumway 1991). El mismo autor informa la presencia de agregados y gránulos de metales acumulados en el riñón en otras especies de ostiones como *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819) y *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). Además, señala que los moluscos bivalvos han sido usados como eficientes bioindicadores por su capacidad de bioacumular compuestos químicos (e.g. metales) en sus tejidos.

Respecto a las condiciones de cultivo, los valores obtenidos de pH y oxígeno no presentaron diferencias entre los estanques con y sin adición de Cu^{+2} , por lo cual se sugiere que no constituyeron un factor determinante en las tasas de mortalidad. La tasa de mortalidad de 0,48 individuos/día para ostiones expuestos a 40 $\mu\text{g/l}$ de Cu^{+2} no es tan severa, considerando la alta concentración de Cu^{+2} a la que fueron expuestos. En *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) altos niveles de Cu^{+2} en los tejidos puede exhibir una inhibición del

crecimiento e incremento en la mortalidad (Shumway *op cit.*). El efecto tóxico del Cu^{+2} puede incluir el bloqueo de grupos funcionales de importantes moléculas (enzimas, polinucleótidos), desplazamiento y/o sustitución de iones esenciales de sitios celulares (Gadd *op cit.*), provocar un complejo metal-proteínas perturbando fuertemente la regulación intracelular desplazando zinc, magnesio y cadmio (Fowler & Gould 1988 *vide Shumway op cit.*), y efectos patológicos al nivel de glándula digestiva (Weis *et al.* 1995).

En cuanto a los altos porcentajes de tolerancia a amikacina y gentamicina de las cepas testeadas, se ha reportado que la concentración de cationes (especialmente magnesio y calcio) afecta los ensayos de susceptibilidad de aminoglicósidos, señalándose además que una alta concentración de cationes produce falsos resistentes y una baja concentración falsos sensibles (Villanova 1990). Sin embargo, la multiresistencia a antibacterianos presentada por las vibronáceas fue acompañada de una multi-tolerancia a metales. La presencia de plásmidos determinada en las cepas tolerantes permiten sugerir que la información contenida en estos podría mediar dichas características. Está bien documentado que los plásmidos participan en el mecanismo de resistencia a antibióticos debido a la presencia de genes que codifican enzimas que inactivan a los antibacterianos (Madigan *et al.* 1997) y actúan como determinantes genéticos de resistencia a metales, como el Cu^{+2} en *Pseudomonas* (Cooksey 1993 y 1994, Cervantes & Silver 1996), *Xanthomonas*, *Alcaligenes denitrificans* (Dressler *et al.* 1991) y *Escherichia coli* (Cervantes & Silver 1996). Además, sugiere la posible transferencia horizontal de genes resistentes contenidos en plásmidos en órganos internos del ostión como glándula digestiva y riñón por bacterias entéricas, como se ha descrito para otros plásmidos (*e.g.* plásmido R100) (Madigan *et al.* 1997).

La acumulación de Cu^{+2} intracelular producto de la exposición de bacterias a Cu^{+2} , ya ha sido reportada anteriormente para bacterias marinas. Riquelme *et al.* (1997), señalaron que bacterias del género *Pseudomonas* epifitas de *Enteromorpha compressa* (Linnaeus) Greville, 1830 presentaron características similares al ser incubadas en presencia del metal.

Es destacable la ausencia de tolerancia a mercurio en los vibrios aislados, comparada con bacterias tolerantes a este metal aisladas en la zona central de Chile (Mondaca, datos no publicados).

Será interesante elucidar en futuros estudios si esta conducta de multiresistencia de los vibrios a altas concentraciones de metales, y multiresistencia a antibióticos es un patrón localizado en la zona norte o es

común para los vibronáceas presentes en el litoral chileno. Además la presencia de vibrios multiresistentes a antibióticos y metales, tendría un efecto directo en la microflora de sistemas de cultivo de ostión, debido a que se ha reportado la transmisión vertical bacteriana en *Argopecten purpuratus*, y las vibronáceas son un componente predominante en cultivos larvales de *A. purpuratus* (Riquelme *et al.* 1994, 1995). Esto implicaría la transmisión de genes de resistencia a cultivos larvales. Esto último también debe ser analizado desde el punto de vista de las enterobacteriáceas, ya que es factible la transmisión horizontal a otras bacterias dentro de los ecosistemas marinos, lo cual es relevante en el caso de la bahía de Mejillones debido a que recibe descargas domésticas como también residuos de la industria pesquera.

Conclusiones

Nuestros resultados muestran que la exposición a Cu^{+2} provoca cambios en la respuesta del componente de vibronáceas asociadas a glándula digestiva y riñón, mostrando un incremento de vibrios tolerantes a Cu^{+2} .

Se detectó asociación en forma natural de vibronáceas tolerantes a Cu^{+2} en branquias y glándula digestiva, bordeando los valores de un 20% a un 40% de la población de vibronáceas totales.

Las vibronáceas investigadas muestran una amplia tolerancia a los metales y antibacterianos ensayados. La presencia de plásmidos sugiere que dicha tolerancia puede estar mediada por la información contenida en ellos.

En *A. purpuratus*, el riñón y glándula digestiva son órganos bioindicadores, medido como concentración de Cu^{+2} en tejido.

Además, se puede señalar que los vibrios asociados a *A. purpuratus* en la bahía de Mejillones son un reservorio de genes de multiresistencia a altos niveles de metales y diferentes antibacterianos.

Agradecimientos

Nuestros agradecimientos a la Gerencia de Medio Ambiente perteneciente a Minera Escondida Ltda. por el financiamiento del presente estudio y también el financiamiento parcial de Fondecyt 1970595.

Literatura citada

Austin B. 1988. Marine microbiology, 221 p. Cambridge University Press, Cambridge.

Barry, AL & C Thornsberry. 1991. Susceptibility tests: diffusion test procedures. En: Balows A,WJ Jr Hausler, KL Herrmann, HD Isenberg & HJ Shadomy (Eds). Manual of clinical microbiology. American Society of Microbiology, Washington, D.C., p. 117-1125.

Bordin G, J McCourt & A Rodriguez. 1992. Trace metals in the marine bivalve *Macoma balthica* in the Westerschelde estuary (The Netherlands). Part I: Analysis of total copper, cadmium, zinc and iron concentrations-local and seasonal variations. The Science of the Total Environment 127:255-280.

Cervantes C & S Silver. 1996. Sistemas de resistencia a metales en *Pseudomonas*. Revista Latino-Americana de Microbiología 38:45-64.

Colwell RR 1984. Vibrios in the environment, 621p. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

Cooksey DA, HR Hamid, J Cha & C Lim. 1990. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. Applied and Environmental Microbiology 56:431-435.

Cooksey DA. 1993. Microreview: Copper uptake and resistance in bacteria. Molecular Microbiology 7:1-5.

Cooksey DA. 1994. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. FEMS Microbiology Reviews 14:381-386.

Douillet PA & CJ Langdon. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture 119: 25-40.

Dressler C, U Kües, DH Nies & B Friedrich. 1991. Determinants encoding resistance to several heavy metals in newly isolated copper-resistant bacteria. Applied and Environmental Microbiology 57:3079-3085.

Duxbury T & B Bicknell. 1983. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. Soil Biology & Biochemistry 15:243-250.

Final Report Project ICA N°223. 1996. The biological importance of copper. A Literature Review, 336 p. International Copper Association, Ltd., Nueva York.

Fitch MW, DW Graham, RG Arnold, SK Agarwal, P Phelps, G Speitel Jr & G Georgiou. 1993. Phenotypic characterization of copper-resistant mutants of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Applied and Environmental Microbiology 59:2771-2776.

Gadd GM. 1992. Metals and microorganisms: a problems of definitions. FEMS Microbiology Letters 100:197-204.

Gordon AS, VJ Harwood & S Sayyar. 1993. Growth, copper-tolerant cells, and extracellular protein production in copper-stressed chemostat cultures of *Vibrio alginolyticus*. Applied and Environmental Microbiology 59:60-66.

Hernandez A. 1998. Análisis espacio-temporal de la concentración de cobre disuelto y total en Punta Coloso. Antofagasta, Chile. En: D. Aros (Ed). Minería del cobre, ecología y ambiente costero, 317-331. Editorial Anbal Pinto S.A., Chile.

Kado CI & ST Lju. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. Journal Bacteriology 145:1365-1373.

Madigan MT, JM Martinko & J Parker (Eds). 1997. Brock / Biology of Microorganisms. Eight Edition, 986 p. Prentice Hall, Inc., Nueva Jersey.

Macaskie LE, ACR Dean, AK Cheethons, RJB Jakeman & AJ Sharnulis. 1987. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp.: The chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells. Journal General Microbiology 133:539-544.

Mondaca M, M Abarzúa, K Paredes, T Maugueri & M Martínez. 1993. Transfencia de resistencia a metales pesados en bacterias aisladas del río Bio-Bio VII región, Chile. Revista Latino-Americana de Microbiología 35:39-43.

Moriarty DJW. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. En: R Lésel (Ed). Microbiology in Poecilotherms, p. 218-222, Paris.

Nicolas JL, D Anquer & B Besse. 1990. Influence of bacterial flora on performance of larval rearings in marine aquaculture. En: R. Lésel (Ed). Microbiology in Poecilotherms, p. 177-185, Paris.

Prieur D, G Mevel, JL Nicolas, A Plusquellec & M Vigneull. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. Oceanography Marine Biology Annual Review 28: 277-352.

Riquelme C, P Chavez, Y Morales & G Hayashida. 1994. Evidence for parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Biological Research 27:129-134.

Riquelme C, G Hayashida, N Vergara, A Vasquez, Y Morales & P Chavez. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. Aquaculture 138:49-60.

Riquelme C, A Rojas, V Flores & J A Correa. 1997. Epiphytic bacteria in copper-enriched environmental in northern Chile. Marine Pollution Bulletin 34: 816-820

Rochelle PA, JC Fry, MJ Day & MJ Bale. 1986. An accurate method for estimating size of small and larger plasmid and DNA fragments by gel electrophoresis. Journal General Microbiology 135: 409-424.

Roman DA & L Rivera. 1995. A copper complexation approach for coastal seawater involving chelex ion exchange equilibria and potenciometric techniques. Boletín Sociedad Chilena de Química 40: 055-064.

- Salamanca M.** 1998. Una aproximación al ciclo biogeoquímico del cobre en el ambiente marino costero. En: D Aros (Ed). Minería del cobre, ecología y ambiente costero, p. 377-403. Editorial Aníbal Pinto S.A., Chile.
- Shumway SE (Ed).** 1991. Developments in aquaculture and fisheries sciences, Volume 21. Scallops: Biology, ecology and aquaculture, 1015 p. Elsevier Science Publisher.
- Stromgren T & MV Nielsen.** 1991. Spawning frequency, growth and Mortality of *Mytilus edulis* larvae, exposed to copper and diesel oil. Aquatic Toxicology 21:171-180.
- Silver S & LT Phung.** 1996. Bacterial heavy metal resistance: New surprise. Annual Review Microbiology 50:753-89.
- Villanova PA.** 1990. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test- Forth Edition; approved standard. NCCLS Document M2-A4.
- Weis P, JS Weis, J Couch, C Daniels & T Chen.** 1995. Pathological and genotoxicological observations in oyster (*Crassostrea virginica*) living on chromated copper arsenate (CCA)-treated wood. Marine Environmental Research 39:275-278.

Recibido en diciembre de 1998 y aceptado en agosto de 1999