

Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano

Identification of di-bromide mercury Resistant Bacteria Isolated from Sediment Beaches in Cartagena de Indias, Colombian Caribbean

Rosa Leonor Acevedo Barrios^{1*}; Carlos Alberto Severiche Sierra^{2*}

¹Doctoranda en Toxicología Ambiental, Magister en Microbiología, Bióloga. Docente e Investigadora del grupo de Investigaciones en Sistemas Ambientales y Materiales GISAM de la Universidad Tecnológica de Bolívar. Cartagena de Indias, Colombia. *rosautb@gmail.com

²Magister en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, Especialista en Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Químico. Docente e Investigador del grupo de Investigaciones en Sistemas Ambientales y Materiales GISAM de la Universidad Tecnológica de Bolívar. Cartagena de Indias, Colombia. *cseveriches@gmail.com

Fecha de recepción del artículo: 02/08/2013 Fecha de aceptación del artículo: 29/10/2013

Resumen

En este estudio se identifican de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas en sedimentos marinos de playas de la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia, mediante el aislamiento, purificación y preservación bacterias marinas resistente a antibióticos, la identificación microscópica y bioquímica, prueba susceptibilidad a di-bromo-mercurio. El desarrollo de este estudio constituye la ejecución para el monitoreo de la presencia de bacterias resistentes a compuestos mercuriales y a antibióticos y/o sus genes de resistencia en el medioambiente asociados tóxicos ambientales y el origen de la fuente de contaminación que genera la resistencia.

Palabras clave

Bacterias, Di-bromo-mercurio, Sedimentos marinos, Playas.

Abstract

This study identified di bromo-resistant bacteria in marine sediments mercury isolated beaches of Cartagena de Indias, Colombia, by the isolation, purification and preservation of marine bacteria resistant to antibiotics, microscopic and biochemical identification, susceptibility test di-bromo-mercury. The development of this study is to monitor the execution of the presence of bacteria resistant to antibiotics and mercury compounds and / or their resistance genes in the environment associated with environmental toxins and the origin of the source of pollution generated by the resistance.

Keywords

Bacteria, Beaches, Di-bromide-mercury, Marine sediments.

I. Introducción

Los hidrocarburos recalcitrantes y metales pesados son considerados contaminantes de importancia por su impacto social y ambiental. Entre los segundos se encuentra el mercurio (Hg), siendo las actividades antropogénicas su principal fuente emisora. Los compuestos mercuriales son neurotóxicos y carcinogénicos (Barkay & Wagner, 2005).

El mercurio (Hg) es un metal pesado altamente tóxico, que amenaza a la salud humana y al medioambiente. Se encuentra en la naturaleza en formas inorgánicas y orgánicas siendo todas tóxicas, especialmente la última, debido a su alta liposolubilidad, lo que facilita su biomagnificación en la cadena trófica. Debido al alto riesgo que representan los ambientes contaminados con Hg, surge la necesidad de tratarlos de manera efectiva, lo cual se puede realizar utilizando estrategias de saneamiento ambiental, tales como la remediación biológica, que comprende a la bío-, fico-, fito- y rizorremediación.

Existe una amplia variedad de bacterias facultativas que pueden crecer en presencia de compuestos mercuriales, algunas de las cuales forman biopelículas, generando un gradiente de concentraciones como medio de protección ante la toxicidad de los compuestos. La tolerancia de una amplia variedad de bacterias al mercurio puede deberse a un contacto permanente con este elemento en condiciones especiales. Algunas bacterias son capaces de utilizar estos compuestos (organomercuriales) como fuentes de carbono o de energía y producir compuestos menos tóxicos, lo cual generalmente ocurre a través de cuatro mecanismos: reducción enzimática a mercurio elemental y su posterior volatilización (con ayuda de la enzima mercurio reductasa); formación del compuesto HgS, el cual es precipitado; producción de tioles volátiles vía mineralización como compuestos sulfato-mercuriales; y quelación de iones de mercurio en la matriz exopolimérica de una biopelículas (Essa et al., 2002; BR, 2006; Dominguez, 2007).

Las biopelículas ofrecen a las células bacterianas varios beneficios, entre los que se encuentra princi-

palmente la protección, debido a que su formación puede reducir los procesos de transferencia de calor y energía. Con las células embebidas en una matriz de polisacárido, las biopelículas son altamente resistentes a antibióticos y a otros tóxicos como los derivados del Hg, pero tienen mayor frecuencia de variabilidad genética que las células no formadoras de biopelículas (Costerton et al., 1999; Picioareanu, 1999; Davey & O' Toole, 2000; Watnick & Kolter, 2000; CBE, 2006; Dominguez, 2007).

En este estudio se lleva a cabo la caracterización microscópica, bioquímica, pruebas de susceptibilidad de nueve géneros bacterianos aislados a partir de sedimentos de playas, expuestos a diferentes concentraciones de 10 a 500 ppm de di-bromo-mercurio; estos géneros también presentaron resistencia a diversos antibióticos. Sin embargo, ante el poco conocimiento e información relacionada con la presencia de bacterias resistentes en ambientes, el desarrollo de este estudio constituye la ejecución para el monitoreo de la presencia de bacterias resistentes a compuestos mercuriales y a antibióticos y/o sus genes de resistencia en el medioambiente, asociados tóxicos ambientales y el origen de la fuente de contaminación que genera la resistencia.

2. Materiales y métodos

La metodología a desarrollar en este proyecto comprende tres etapas.

2.1 Aislamiento, purificación y preservación bacterias marinas resistentes a antibióticos

Las técnicas de aislamiento, purificación y preservación de las cepas de bacterias fueron empleados según las recomendaciones descritas por Castañeda et al., 2009.

Las muestras de sedimentos fueron recolectados con draga metálica tipo Van Veen a 20 cm de profundidad en playas de la ciudad de Cartagena, en seis puntos:1). Desembocadura de la ciénaga en La

Boquilla (75° 29'45" N 10°32'29" W), 2). Boquilla - Restaurante Caracolí (75° 33'59" N 10°23'41" W), 3). La Bocana (75° 33'05" N 10°23'20" W), 4). Crespo-Comfenalco (75° 33'47"N 10°23'45"), 5) Marbella-Reloj (75° 33'35"N 10°23'15W) y 6) Cabrero-semáforo (75° 34'36"N 10°24'16"W). La muestra fue tomada con un hisopo estéril, rotado en el interior del sedimento, luego inoculado en un tubo previamente estéril con agua peptonada al 10 % como medio de transporte. Todas las muestras fueron conservadas en refrigeración y transportadas al laboratorio, hasta el proceso de aislamiento.

El aislamiento de las bacterias fue realizado mediante la técnica de siembra masiva a partir de asadas tomadas del medio de transporte a medio TSA, posteriormente incubados a 37°C durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación las colonias aisladas, fueron trasladadas a medios selectivos -S-S (Salmonella-Shigella), -TCBS (Vibrios), -Mac Conkey (Enterobacterias), Baird- Parker (Cocos gram positivos) incubadas a 37°C durante 24 horas y finalmente trasladadas a medio LB (Luria Bertani) para posteriores ensayos.

Una colonia bacteriana fue transferida 50 mL caldo LB (Luria Bertani), incubadas a 30°C durante 12 horas a 120 rpm ajustándose su densidad celular de 0.8 - 1.0 a un O.D de 620 nm. Transcurrido este período de incubación, 720 µL de cada suspensión fue transferido a crío viales con 80 µL de glicerol al 10%, los cuales fueron almacenados a -80°C. Asimismo, fue implementado como método de conservación a largo plazo la liofilización, manteniéndose cada cepa a -20 °C.

Dentro de los requerimientos especiales se incluye la presentación de tablas, figuras, ecuaciones, referencias, unidades, abreviaturas y acrónimos.

2.2 Identificación microscópica y bioquímica

Para la identificación microscópica fue empleado la tinción de Gram (bacilos Gram-negativos y cocos

Gram positivos), observados en un microscopio Olympus BX41, de acuerdo con las claves taxonómicas del Manual de Bergys y Atlas Microbiológico de Koneman, 2008.

La actividad metabólica de las bacterias fue determinada empleando el sistema de identificación BBL Crystal™ Kit ID para bacterias Gram negativas no fermentadoras y Gram positivas, siguiendo las indicaciones de la casa comercial y Mostafa et al., 2011. Además fueron realizadas la prueba de Oxidasa, Catalasa, Lactosa y Coagulasa (solo para cocos gram).

2.3 Identificación microscópica y bioquímica

Una colonia de 24 horas de incubación fue suspendida en caldo LB a 0.5 en la escala de Mac Farland; luego, con un hisopo previamente estéril, la suspensión fue inoculada por siembra masiva en caldo LB Hinton con diferentes concentraciones de Di-bromo-mercurio (10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 45 ppm, 60 ppm, 75 ppm, 90 ppm, 105 ppm, 120 ppm, 135 ppm, 150 ppm y 180 ppm); posteriormente, se identificaron como bacterias resistentes a di-bromo-mercurio, aquellas que presentaron turbidez a las 24 horas de inoculada en el caldo LB con las diferentes concentraciones de Mercurio; luego de esto se sembraron en Agar LB para descripción de colonias y realización de tinción de Gram para confirmar la pureza de la cepa.

3. Resultados y discusión

Un total de nueve géneros de bacterias marinas resistentes a di-bromo-mercurio fueron aisladas de sedimentos de playas del caribe colombiano, de los cuales ocho corresponden a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp, *Acinetobacter* sp) y 1 a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus* sp), representadas en la Tabla 1 y la Figura 1.

El análisis bioquímico fue realizado mediante kit BD Crystal™ para bacterias Gram negativas no

fermentadores aerobias y kit BD Crystal™ para Gram positivas.

Tabla 1. Aislamiento de bacterias resistentes a mercurio en playas de Cartagena.

Código	Muestra	Ubicación	Método de Aislamiento	Genero y Especie†
BRCC-P001	Sedimentos marinos	Boquilla, Crespo	TSA-caldo agua de mar	<i>Escherichia coli</i>
BRCC-P002	Sedimentos marinos	Boquilla, Crespo, Marbella	TSA-caldo agua de mar	<i>Enterobacter sp</i>
BRCC-P003	Sedimentos marinos	Crespo, Marbella	TSA-caldo agua de mar	<i>Serratiasp</i>
BRCC-P004	Sedimentos marinos	Boquilla, Crespo, Cabrero	TSA-caldo agua de mar	<i>Klebsiella sp</i>
BRCC-P005	Sedimentos marinos	Boquilla, Crespo, Marbella, Cabrero	TSA-caldo agua de mar	<i>Vibrio sp</i>
BRCC-P006	Sedimentos marinos	Boquilla, Marbella	TSA-caldo agua de mar	<i>Salmonella sp</i>
BRCC-P007	Sedimentos marinos	Marbella y Cabrero	TSA-caldo agua de mar	<i>Acinetobacters sp</i>
BRCC-P008	Sedimentos marinos	Crespo, Marbella y Cabrero	TSA-caldo agua de mar	<i>Enterobacteria sp3</i>
BRCC-P009	Sedimentos marinos	Crespo, Marbella y Cabrero	TSA-caldo agua de mar	<i>Staphylococcus sp</i>

† La identificación de los caracteres morfológicos y taxonómicos basados en el Manual de Beryis (1992) y Atlas Microbiológico de Koneman (2002).

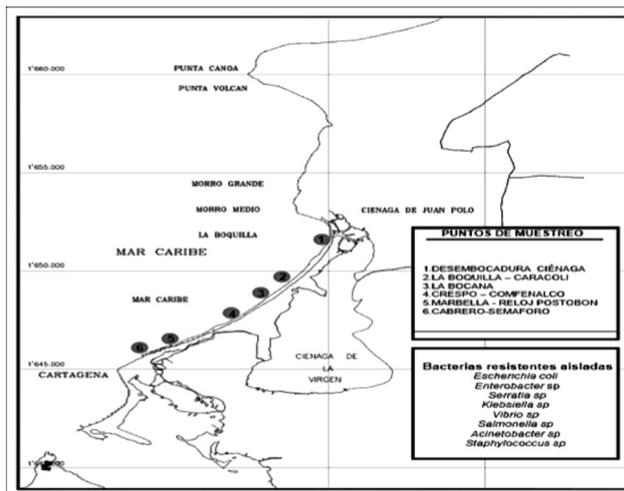


Figura 1. Puntos de muestreo para aislamientos de bacterias resistentes a Hg en sedimentos marinos de Cartagena

La prueba de susceptibilidad de las bacterias aisladas a diferentes concentraciones de di-bromo-mercurio, presentaron grado de resistencia frente al compuesto, en las concentraciones de 10 ppm a 180 ppm se observó la formación de biopelículas

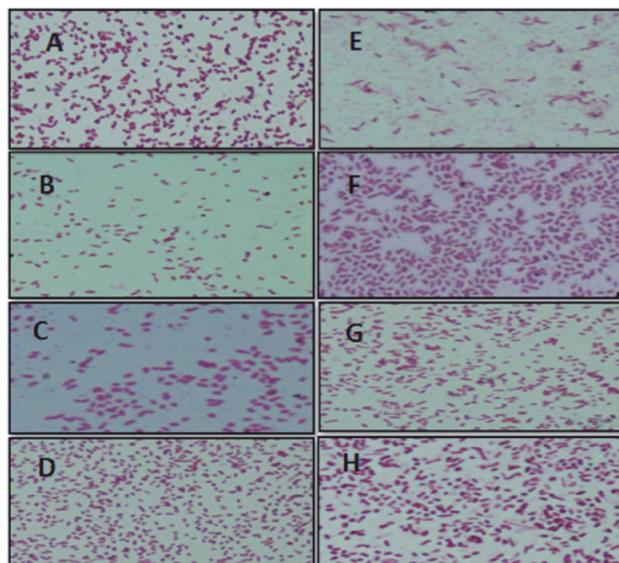


Figura 2. Micrografía de géneros resistentes a di-bromo-mercurio aislados de sedimentos de playas de Cartagena de Indias. A. *Escherichia coli*. B. *Enterobacter sp*. C. *Serratia sp*. D. *Klebsiella sp*. E. *Vibrio sp*. F. *Salmonella sp*. G. *Acinetobacter sp*. H. *Enterobacteria sp3*

en los nueve géneros bacterianos aislados a partir de sedimentos marinos de playas de Cartagena, donde se observó resistencia a di-bromo-mercurio.

En la Figura 3, se muestran los microorganismos aislados de sedimentos de playas de Cartagena de Indias. A. *Escherichia coli* sin exposición al Tóxico A' *Escherichia coli* con exposición al Tóxico. B. *Enterobacter sp*. sin exposición al Tóxico B' *Enterobacter sp* con exposición al Tóxico C. *Serratia sp* sin exposición al Tóxico C' *Serratia sp* con exposición al Tóxico. D. *Klebsiella sp* sin exposición al Tóxico. D' *Klebsiella sp* con exposición al Tóxico. E. *Vibrio sp* con exposición al Tóxico. E' *Vibrio sp* F. *Salmonella sp*. F' con exposición al Tóxico G. *Acinetobacter sp* sin exposición al Tóxico G' *Acinetobacter sp* con exposición al Tóxico H. *Enterobacteria sp3* sin exposición al Tóxico. H' *Enterobacteria sp3* con exposición al Tóxico.

Los microorganismos aislados de sedimentos de playas Cartagena de Indias. A. *Escherichia coli* sin exposición al Tóxico A' *Escherichia coli* con exposición al Tóxico. B. *Enterobacter sp*. sin exposición al Tóxico B' *Enterobacter sp* con exposición al Tóxico

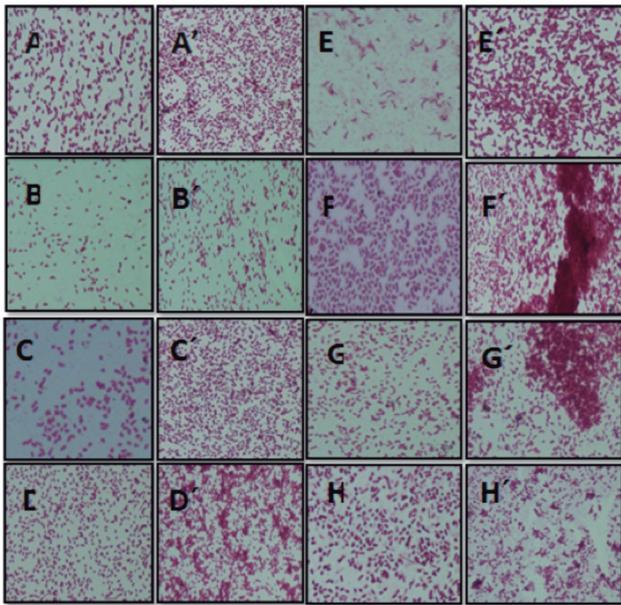


Figura 3. Micrografía de formación de biofilms de los géneros resistentes a di-bromo-mercurio.

C. *Serratia* sp sin exposición al Tóxico C' *Serratia* sp con exposición al Tóxico. D. *Klebsiella* sp sin exposición al Tóxico. D' *Klebsiella* sp con exposición al Tóxico. E. *Vibrio* sp con exposición al Tóxico. E' *Vibrio* sp F. *Salmonella* sp. F' con exposición al Tóxico G. *Acinetobacter* sp sin exposición al Tóxico G' *Acinetobacter* sp con exposición al Tóxico H. *Enterobacteria* sp 3 sin exposición al Tóxico. H' *Enterobacteria* sp 3 con exposición al Tóxico.

Algunas bacterias son capaces de utilizar estos compuestos (organomercuriales) como fuentes de carbono o de energía y producir compuestos menos tóxicos, lo cual generalmente ocurre a través de cuatro mecanismos: A). Reducción enzimática a mercurio elemental y su posterior volatilización (con ayuda de la enzima mercurio reductasa). B). Formación del compuesto HgS el cual es precipitado. C. Producción de tioles volátiles vía mineralización como compuestos sulfato-mercuriales. D). Quelación de iones de mercurio en la matriz exopolimérica de una biopelícula (Essa et al., 2002; BR, 2006; Dominguez-Benetton, 2007).

Existe una amplia variedad de bacterias facultativas que pueden crecer en presencia de compuestos mercuriales, algunas de las cuales forman biopelículas

generando un gradiente de concentraciones como medio de protección ante la toxicidad de los compuestos.

Las biopelículas ofrecen a las células bacterianas varios beneficios, entre los que se encuentra principalmente la protección debido a que su formación puede reducir los procesos de transferencia de calor y energía. Con las células embebidas en una matriz de polisacárido, las biopelículas son altamente resistentes a antibióticos y a otros tóxicos como los derivados del Hg, pero tienen mayor frecuencia de variabilidad genética que las células no formadoras de biopelículas.

4. Conclusiones y recomendaciones

Realizar otros muestras para aislamiento e identificación de otros generos de bacterias resistentes a antibioticos y a di-bromo-mercurio aisladas en sedimentos de playas de Cartagena. Ampliar el grupo de antibioticos a enfrentar con las bacterias aisladas en sedimentos marinos para determinar le grado de sensibilidad o resistencia a ellos. Realizar una curva de resistencia a derivados del Hg para identificar la CL50 de bacterias frente a estos contaminantes ambientales. Realizar la caracterización molecular de los géneros bacterianos aislados por amplificación por PCR y electroforesis. Se recomienda la utilización de primers específicos para amplificar gen de resistencia de bacterias asiladas en sedimentos marinos. Es necesario realizar estudios para el monitoreo de la presencia de bacterias resistentes a antibióticos y a derivados del mercurio así como los genes que expresan resistencia en el medioambiente, para determinar su asociación con tóxicos ambientales y el origen de la fuente de contaminación que genera la resistencia. Ampliar los puntos de muestreo de las playas de Cartagena.

Referencias

1. Aparicio, D. Caracterización de la flora bacteriana marina resistente a derivados mercuriales

- presentes en el sedimento de la bahía de Cartagena. Tesis de maestría en microbiología, Universidad de Cartagena, 2005.
2. Atlas, Ronald; Bartha, Richard. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Editorial Pearson Addison-Wesley. Cuarta Edición. 2009.
 3. Ayokunle Christopher y Ahmad Asmat. Speciation and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. *Environ Monit Assess* 185: 1583-1599, 2013.
 4. Barkay T. y Wagner-Dobler I. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. *Advances in applied microbiology*. 2-40. 2005.
 5. Begon Michael, C. R. Townsend & J. L. Harper. *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. BlackwellScienceInc; 3rd edition. 2009.
 6. Castañeda, Y; Figueroa, Y; López, P; J, Fuentes. Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación aisladas de aguas y sedimentos marinos de cuatro playas del estado nueva Esparta. *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología*. 2005.
 7. Castañeda, Y; López, P; Figueroa, R y Fuentes J. Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la isla de margarita, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*. Vol. 21 N° 1: 12-19. 2009.
 8. Corzo Lucioni, Alberto. *Química y Toxicología Ambiental*. 2012.
 9. De La Rosa, Manuel. *Microbiología en Ciencias de la salud. Conceptos y Aplicaciones*. Acceso On Line, 3 edición. ISBN: 9788480866927. 2011.
 10. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. *Introducción a la Microbiología*. 2010.
 11. Goodwin, Kelly; McNay, Melody; Cao Yiping; Ebentier, Darcy, Madison, Melissa y Jhon Griffith. A multi-beach study of Staphylococcus aureus, MRSA, and Enterococci in seawater and beach sand. *Sciverse Science Direct*. 4195-4207, 2012.
 12. Khan Asad. *Current trends in Antibiotic Resistance in Infectious Diseases*. 2009.
 13. Koneman. *Diagnostico Microbiológico. Texto y Atlas a color*. Editorial Panamericana. Sexta edición. 2008.
 14. Martínez, Armando; Cruz, Mario; Veranes, Oiris; Carballo, María Elena; Salgado, Irina; Olivares, Susana; Lima, Lázaro; Rodríguez, Danae. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 41, pp. 1-10. Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba. 2010.
 15. Moore, Jhon; Juñuri R; Peter J; Millar Cherie, Goldmith Colin; Loughrey Anne y Rooney Paul. Antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change?. *AquatEcol* 44:349-358, 2010.
 16. Morales Vaca, Mercedes. *Manual de Toxicología de Analítica*. ISBN: 978-99954-0-824-4. 2011.
 17. Morris K, Battle against antibiotic resistance is being lost. *Lancet infect Dis* 7:509. 2010.
 18. Muñoz, Daniel; Castañeda, Yeisy; Graü de Marín, Crucita; Marva, Hilda. Prevalencia y Susceptibilidad a Antibióticos de cepas móviles de Aeromonas aisladas del Ostión de Mangle (Crassostrearhizophorae). *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXII, N° 6*, 565 - 573, 2012.
 19. Mostafa, Eissa, Mohammed Seif y Din Ashour El. *Microbiological Environmental Monitoring in Pharmaceutical Facility*. Egypt. *Acad. J. biolog. Sci.*, 3(1): 63- 74. 2011.
 20. Nelson R, Novel antibiotics show efficacy against resistant bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2006.
 21. Parisien A, Alain B, Zhang J, et al Novel Alternativas to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* 104:1:13. 2008.
 22. Pousa Lucio, Xoan Manuel. *La Gestión Medioambiental: un Objetivo Común. Ideas propias* Editorial. 1ª edición.: 6:397-8. 2006.
 23. Rizzo, L; Manaia, C; Merlin C; Schwartz, T; Dagot, C; Ploy, M; Michel y D, Fatta-Kassinou. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes

- spread into environment: A review. *Science of the Total Environment*, 447: 345-360, 2013.
24. Ryan, J Kenneth. *Microbiología Médica*. 5 Edición Editorial Mcgraw-Hill. 2011.
 25. Sánchez Yáñez, Juan Manuel. *Biorremediación. Estrategias contra la contaminación Ambiental*. Libros en red. 2011.
 26. Solorio Smith Rafael. *Ecología para el Rescate de la Tierra*. Libros On line. 2011.
 27. Venegas, M; Correa, N; Morales, A; Martínez; Rugeles, A y Jiménez, F. Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos. *Rev. MVZ Córdoba* 14(2):1677-1683, 2009.
 28. Volles DF, Branam TN. Antibiotics in the intensive care unit: focus on agents for resistant pathogens. *Emerg Med Clin N Am* 26:813-34. 2008.
 29. Wiles JA, Hashimoto A, Thanasi JA, Isothiazolopyridones: synthesis, structure and biological activity of a new class of antibacterial agents. *J Med*; 49:39-42. 2006.