
POSIBLES IMPLICANCIAS AMBIENTALES DEBIDO A LA RESISTENCIA A METALES PESADOS EN BACTERIAS AISLADAS DE EXCRETAS DEL PINGÜINO DE HUMBOLDT

Winfred Espejo, Marco Sandoval, José E. Celis, Juana López y Fredy Riquelme

RESUMEN

El monitoreo de la resistencia a los antibióticos en la fauna silvestre de zonas remotas puede ser una valiosa herramienta para evaluar el impacto de la presión antrópica. Se investigó el efecto de la contaminación con arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), cobre (Cu) y zinc (Zn) sobre poblaciones bacterianas aisladas en excretas del pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*). Se estudiaron comunidades bacterianas provenientes de tres lugares importantes de anidación del pingüino de Humboldt en la costa de Chile: Isla Pan de Azúcar, Isla Chañaral e Isla Cachagua. Se evaluaron los patrones de resistencia de bacterias a metales pesados y antibióticos. Hubo diferencias en las bacterias resistentes a metales pesados entre colonias de pingüinos. Todas las cepas bacterianas aisladas de los excrementos

de pingüino en las tres localidades mostraron resistencia al Zn. Las cepas bacterianas aisladas de heces en isla Cachagua exhibieron la más alta resistencia al As, Cu y Pb, siendo este lugar el que exhibió las más altas concentraciones para estos metales. Las muestras de Isla Cachagua indican que *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Pseudomonas spp.* y *Brevundimonas vesicularis* fueron resistentes al Cd. El metal más tóxico fue Cd, seguido por Cu. Todas las bacterias Gram (+) mostraron resistencia a cefapirin, oxitetraciclina, florfenicol, amoxicilina, gentamicina, penicilina y sulfatrimet, mientras que las bacterias Gram (-) fueron resistentes a penicilina y sulfatrimet. Las cepas resistentes a metales pesados podrían afectar los ciclos orgánicos e inorgánicos en aquellos sitios donde habita el pingüino de Humboldt.

Introducción

La contaminación del agua, aire y suelo por metales pesados es uno de los problemas ambientales más graves provocados por el hombre (Blais *et al.*, 2007). Las fuentes más comunes de contaminación por dichos metales son los procesos industriales, los vertidos municipales y la minería (Muñoz y Becker, 1999). En Chile, como consecuencia del desarrollo minero en el norte y el desarrollo industrial en la zona central, se registra una creciente y preocupante contaminación ambiental en los ecosistemas costeros por las altas concentraciones de metales que afecta desde el subsuelo hasta la atmósfera,

incluyendo suelos y cuerpos de agua (Salamanca *et al.*, 2004). En estas zonas del país se concentran muchas colonias de pingüinos de Humboldt, las cuales se ven afectadas por estas actividades antropogénicas (Celis *et al.*, 2014). El pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) es una especie de ave marina que habita el litoral de las costas del Perú y de Chile; se alimenta en el mar en base a una dieta constituida principalmente de peces, complementado con calamares y crustáceos (Martínez y González, 2004). Muchos metales pesados son incorporados al organismo a través de la dieta, y una gran parte de ellos son excretados por el

pingüino una vez que está en tierra (Celis *et al.*, 2014).

La presencia de metales pesados en el ambiente puede modificar la flora microbiana que allí habita, dependiendo de la concentración de estos elementos químicos (Montuelle *et al.*, 1994). Existe evidencia que indica que la contaminación con metales pesados puede favorecer la resistencia bacteriana tanto en ambientes marinos como terrestres (Baker-Austin *et al.*, 2006) y que algunos organismos pueden ser portadores de genes resistentes a los antibióticos (Singer *et al.*, 2006). La resistencia a metales pesados en poblaciones bacterianas puede considerarse como un fenómeno ambiental de selección na-

tural para la supervivencia de las especies, lo que podría alterar la biota bacteriana autóctona de los ecosistemas (Pathak y Gopa, 2005; Baker-Austin *et al.*, 2006). Se ha visto que bacterias nativas del género *Pseudomonas* que habitan en suelos de ambientes mineros presentan resistencia a metales pesados tales como Cd, Cu y Pb (Monge-Amaya *et al.*, 2008). De este modo, la contaminación de los ecosistemas costeros puede tener repercusiones que van más allá de afectar a la población del pingüino de Humboldt, pues la exposición de bacterias autóctonas a altas concentraciones de metales pesados podría significar la aparición de cepas resistentes, cuyas conse-

PALABRAS CLAVE / Antibióticos / Aves Marinas / Contaminación / Metales Pesados / Pingüinos / Resistencia Microbiana / *Spheniscus humboldti* /

Recibido: 10/03/2016. Modificado: 15/05/2017. Aceptado: 17/05/2017.

Winfred Espejo. Médico Veterinario. Candidato al doctorado, Centro EULA, Universidad de Concepción (UdeC), Chile.

Marco Sandoval. Maestría en Edafología, Universidad Autónoma Chapingo, México. Doc-

tor en Ciencias Ambientales, Centro EULA- Chile. Profesor e Investigador, UdeC, Chile.

José E. Celis. Maestría en Recursos Naturales, Michigan State University, EEUU. Doctor en Ciencias Ambientales, Centro

EULA-Chile. Profesor e Investigador, UdeC, Chile. Dirección: Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UdeC. Av. Vicente Méndez 595, Chillán, Chile. e-mail: jcelis@udec.cl

Juana López. Maestría en Ciencias, UdeC, Chile. Profesora e Investigadora, UdeC, Chile.

Fredy Riquelme. Tecnólogo Médico. Profesional laborante, UdeC, Chile.

POSSIBLE ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS FROM HEAVY METAL RESISTANCE OF BACTERIA ISOLATED FROM EXCRETA OF HUMBOLDT PENGUIN

Winfred Espejo, Marco Sandoval, José E. Celis, Juana López and Fredy Riquelme

SUMMARY

Monitoring antibiotic resistance in wildlife from remote areas can be a valuable tool for evaluating the impact of human pressure. We investigated the effect of contamination with arsenic (As), lead (Pb), cadmium (Cd), copper (Cu) and zinc (Zn) on bacterial populations isolated from excreta of the Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). Bacterial communities were studied at three important nesting places of the Humboldt penguin on the Chilean coast of Chile: Pan de Azúcar Island, Chañaral Island, and Cachagua Island. Bacteria resistance patterns to heavy metals and antibiotics were evaluated. There were differences in heavy metal-resistant bacteria between colonies of penguins. All bacterial strains isolated from penguin droppings in all three

locations showed resistance to Zn. Bacterial strains isolated from feces in Cachagua Island exhibited the highest resistance to As, Cu and Pb, being this location that which exhibited the highest concentrations for these metals. Samples from Cachagua Island indicated that *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Pseudomonas spp.* and *Brevundimonas vesicularis* were resistant to Cd. The most toxic metal was Cd, followed by Cu. All gram (+) bacteria showed resistance to cefepirin, oxytetracycline, florfenicol, amoxicillin, gentamicin, penicillin, and sulfatrimet, whereas gram (-) bacteria were resistant to penicillin and sulfatrimet. Metal-resistant strains could affect the organic and inorganic cycles at places where Humboldt penguin lives.

POSSÍVEIS IMPLICÂNCIAS AMBIENTAIS DEVIDO À RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE EXCRETAS DO PINGÜIM DE HUMBOLDT

Winfred Espejo, Marco Sandoval, José E. Celis, Juana López e Fredy Riquelme

RESUMO

O monitoramento da resistência aos antibióticos na fauna silvestre de áreas remotas pode ser uma valiosa ferramenta para avaliar o impacto da pressão antrópica. Investigou-se o efeito da contaminação com arsênico (As), chumbo (Pb), cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) sobre populações bacterianas isoladas em excretas do pingüim de Humboldt (*Spheniscus humboldti*). Estudaram-se comunidades bacterianas provenientes de três lugares importantes de anidación do pingüim de Humboldt na costa do Chile: Ilha Pan de Azúcar, Ilha Chañaral e Ilha Cachagua. Avaliaram-se os padrões de resistência de bactérias a metais pesados e antibióticos. Houve diferenças nas bactérias resistentes a metais pesados entre colônias de pingüins. Todas as cepas bacterianas isoladas dos excrementos

de pingüim nas três localidades mostraram resistência ao Zn. As cepas bacterianas isoladas de fezes em ilha Cachagua exibiram a mais alta resistência ao As, Cu e Pb, sendo este local o que exibiu as mais altas concentrações para estes metais. As amostras de Ilha Cachagua indicam que *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Pseudomonas spp.* e *Brevundimonas vesicularis* foram resistentes ao Cd. O metal mais tóxico foi Cd, seguido por Cu. Todas as bactérias Gram (+) mostraram resistência a cefepirin, oxitetraciclina, florfenicol, amoxicilina, gentamicina, penicilina e sulfatrimet, enquanto que as bactérias Gram (-) foram resistentes a penicilina e sulfatrimet. As cepas resistentes a metais pesados poderiam afetar os ciclos orgânicos e inorgânicos naquelas regiões onde habita o pingüim de Humboldt.

cuencias pueden ser graves para el ambiente (Nies, 2003). A nivel mundial se estima que sobre el 70% de las enfermedades infecciosas emergentes tienen su origen en la fauna silvestre, y además de aumentar significativamente con el tiempo, la mayoría de los patógenos que las provocan presentan resistencia a antibióticos (Jones *et al.*, 2008). Esto implica que muchos lugares donde viven especies silvestres podrían estar experimentando los mismos problemas.

La influencia antrópica juega un papel importante en la contaminación de los ecosistemas marinos y terrestres, lo que se ha visto reflejado por la cercanía de las infraestructuras o de

núcleos urbanos a los nichos silvestres (Salamanca *et al.*, 2004; Celis *et al.*, 2014). La contaminación por metales pesados sobre la flora microbiana no ha sido cabalmente estudiada en fauna de zonas costeras de Chile (Moraga *et al.*, 2003). La exposición a altas concentraciones de metales pesados podría estar influyendo en la susceptibilidad de las bacterias gastrointestinales de especies como el pingüino de Humboldt. Más aún, ciertos estudios han mostrado que la contaminación con metales en ambientes naturales podría tener un importante rol en la proliferación de la resistencia a antibióticos usados en humanos y en animales (Alonso *et al.*,

2001; Summers, 2002; Rose *et al.*, 2009). Esto ha motivado la realización de algunos estudios sobre susceptibilidad a metales pesados en bacterias que habitan en los ecosistemas costeros de Chile (Mondaca *et al.*, 1993; Moraga *et al.*, 2003). Sin embargo, estos estudios se han realizado sobre la base de matrices abióticas y no sobre matrices bióticas como las excretas, donde las bacterias gastrointestinales de especie silvestres que habitan los ecosistemas costeros podrían tener importancia. No se sabe si la contaminación por metales pesados tiene incidencia sobre la flora microbiana de estas aves marinas en relación a los hábitats a los que estas

especies están vinculadas. En este estudio, se pretende 1) determinar si existe resistencia a metales como Cd, As, Pb, Cu y Zn en bacterias presentes en excretas de colonias de pingüinos de Humboldt que anidan en tres lugares de la costa chilena, y 2) investigar si dichos metales tienen efecto sobre la resistencia bacteriana a algunos de los antibióticos usados en humanos y en veterinaria.

Metodología

Recolección de muestras

Los muestreos se llevaron a cabo entre diciembre 2011 y enero 2012 desde tres lugares del litoral chileno donde

habitualmente anidan estas aves (Figura 1): Isla Pan de Azúcar (26°09'S, 70°40'O), Isla Chañaral (29°01'S, 71°34'O) e Isla Cachagua (32°35'S, 71°27'O). Se recolectaron 20 muestras frescas de excretas (~5g cada una) de pingüinos de Humboldt, correspondientes a un grupo de animales de la colonia y no de un individuo en particular, desde los sitios de anidamiento en cada colonia. Para ello, se utilizaron guantes de látex, espátulas de plástico y bolsas de polietileno Ziploc. Cada muestra se almacenó en un contenedor con hielo (~4°C) hasta su llegada a laboratorio.

La isla Pan de Azúcar es una isla de forma ovalada (1,5x1km) ubicada en el norte de Chile, a 1km de la costa y a 18km de la bahía de Chañaral, lugar donde desechos de la minería fueron vertidos en gran cantidad entre 1938 y 1974 (Vermeer y Castilla, 1991); allí existe una importante población de pingüinos de Humboldt, con ~5000 individuos. Por su parte, la Isla Chañaral es una isla circular (2km de diámetro) situada a 7km de la costa y a 100km al norte de la bahía de Coquimbo; constituye una de las más grandes colonias de pingüinos de Humboldt en el norte de Chile, con una población estimada de 22000 individuos. Por su parte, Isla Cachagua está ubicada en la zona central de Chile, y es una pequeña área (250x200m) situada a 100m de la costa y a 20km de la Bahía de Quintero, un área altamente industrializada; a pesar del pequeño tamaño de la isla, Cachagua constituye un lugar de anidación importante para los pingüinos de Humboldt, soportando una población de ~2000 individuos (Meza *et al.*, 1998).

Determinación de la resistencia a metales pesados y antibióticos

Las muestras de excretas fueron pesadas para estandarizar una cantidad fija (5g de peso seco) sobre la cual se trabajó en los análisis. A partir de cada

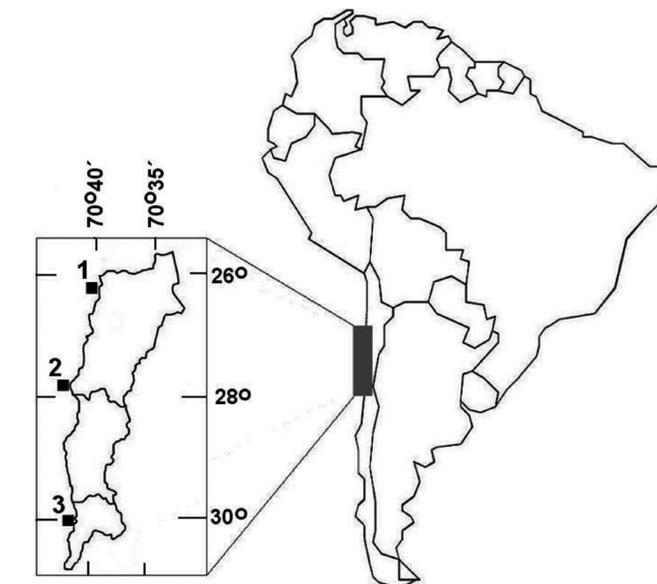


Figura 1. Ubicación geográfica de las colonias de pingüinos de Humboldt en la costa de Chile desde donde se obtuvieron las muestras de excretas.

muestra, 1g fueron sembrados por esparcimiento superficial en placas de Petri con agar R2A y agar ENDO-C (Merck®), las cuales se incubaron por cinco días a temperatura ambiente (20°C). Las colonias desarrolladas se caracterizaron de acuerdo a su morfología y las colonias seleccionadas se traspasaron a placas de agar PCA (Merck®) enriquecido con 800µg·ml⁻¹ de CuSO₄ (Moraga *et al.*, 2003). La identificación bacteriana a partir de las colonias aisladas se basó en estudios de morfología microscópica con tinción Gram y en propiedades bioquímicas. Para la

tipificación de las especies identificadas se utilizó un sistema estandarizado de identificación bacteriana (API).

La resistencia a As, Cd, Cu, Pb y Zn se determinó utilizando las siguientes soluciones (Merck®): N₂AsO₄H·7H₂O, CdCl₂, CuSO₄, Pb(NO₃)₂ y ZnCl₂ (Moraga *et al.*, 2003). Para Zn las concentraciones ensayadas fueron 3200, 1600, 800, 400 y 200µg·ml⁻¹, para As, Cu y Pb fueron 1600, 800, 400, 200 y 100µg·ml⁻¹, mientras que para Cd los niveles testeados fueron 400, 200, 100, 50 y 25µg·ml⁻¹ (Mondaca *et al.*, 1993). La resistencia

bacteriana se determinó a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para estos metales (Anisimova *et al.*, 1993). Los ensayos se realizaron en agar PCA suplementado con el metal. Las placas se sembraron con un replicador Steel y fueron incubadas por 48h.

La resistencia a antibióticos se estudió mediante la técnica de difusión en placa, en base a las definiciones dadas por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Matuschek *et al.*, 2013). Se utilizaron los siguientes antibióticos (Merck®): oxitetraciclina (30µg·ml⁻¹), penicilina (10µg·ml⁻¹), gentamicina (10µg·ml⁻¹), florfenicol (30µg·ml⁻¹), amoxicilina (20µg·ml⁻¹), sulfatrimet (25µg·ml⁻¹) y cefapirina (30µg·ml⁻¹). Las cepas fueron reactivadas desde partidas congeladas, cultivadas en placa por triplicado y chequeadas para ver crecimiento bacteriano después de 24, 48 y 72h. Se utilizaron tres repeticiones en cada caso. Los resultados se registraron como sensible o resistente; no se consideró el crecimiento intermedio.

Resultados

Del análisis de las muestras de excretas obtenidas de las diferentes colonias de pingüinos de Humboldt, se logró identificar diferentes cepas bacterianas (Tabla I). Las bacterias Gram negativas tales

TABLA I
BACTERIAS AISLADAS EN EXCRETAS DEL PINGÜINO DE HUMBOLDT (*Spheniscus Humboldtii*), CANTIDAD DE CEPAS AISLADAS (N) Y SU NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS TESTEADOS

Familia	Género	Especie	Gram	N	Nivel de susceptibilidad*
Caulobacteriaceae	<i>Brevundimonas</i>	<i>vesicularis</i>	-	20	R (P) / S (OX, G, F, A, SU, CE)
Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>	spp.	-	18	R (P, SU) / S (OX, G, F, A, CE)
Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	<i>indologenes</i>	-	20	R (P) / S (OX, G, F, A, SU, CE)
Flavobacteriaceae	<i>Weeksella</i>	<i>virosa</i>	-	21	R (P) / S (OX, G, F, A, SU, CE)
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>	+	30	S (P, OX, G, F, A, SU, CE)
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	+	20	S (P, OX, G, F, A, SU, CE)
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	+	22	R (P) / S (OX, G, F, A, SU, CE)
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>casseliflavus</i>	+	21	S (P, OX, G, F, A, SU, CE)
Staphylococcaceae	<i>Gemella</i>	<i>morbilloorum</i>	+	20	S (P, OX, G, F, A, SU, CE)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	spp.	-	28	R (P, SU) / S (OX, G, F, A, CE)
Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	+	21	S (P, OX, G, F, A, SU, CE)
Pasteurellaceae	<i>Mannheimia</i>	<i>haemolytica</i>	-	20	R (P) / S (OX, G, F, A, SU, CE)

*R: Resistente / S: Sensible. OX: oxitetraciclina, P: penicilina, G: gentamicina, F: florfenicol, A: amoxicilina, SU: sulfatrimet, CE: cefapirina.

como *Brevundimonas*, *Erwinia*, *Chryseobacterium*, *Weeksella*, *Pseudomonas* y *Mannheimia* presentaron resistencia a penicilina, así como también *Enterococcus durans*, una bacteria Gram positiva. Por su parte, *Erwinia* y *Pseudomonas* presentaron resistencia a sulfatrimet y penicilina.

En las pruebas de susceptibilidad a metales, los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mostraron que el metal más tóxico (con menor CMI) para todas las cepas aisladas resultó ser el Cd, seguido por el Cu (Tabla II). Se encontró que todas las cepas bacterianas aisladas en las excretas del pingüino de Humboldt de las tres localidades estudiadas fueron resistentes al Zn; en cambio, todas las bacterias aisladas de Isla Chañaral no mostraron ninguna resistencia al Cu, siendo este lugar el más alejado de la costa. Todas las bacterias aisladas de Isla Cachagua y la mayoría de las bacterias de Isla Pan de

Azúcar (exceptuando *C. indogenes* y *M. luteus*) mostraron resistencia al Pb, mientras que por el contrario las cepas bacterianas de Isla Chañaral no mostraron ninguna resistencia a este metal. Por su parte, *E. durans*, *E. faecium*, *Pseudomonas* spp. y *B. vesicularis* aisladas de las excretas obtenidas de Isla Cachagua mostraron resistencia al Cd. Por otra parte, solo *M. haemolytica* y *Pseudomonas* spp. de Isla Pan de Azúcar mostraron resistencia al Cd. La mayoría de las cepas de Isla Cachagua e Isla Pan de Azúcar fueron resistentes al As, pero no así las aisladas de Isla Chañaral. Se notó que las cepas resistentes presentaron simultáneamente resistencia a dos o más metales, particularmente en aquellas cepas aisladas de Isla Cachagua (Figura 2). Se observó una mayor resistencia al As, Cu y Pb en las cepas bacterianas aisladas de las excretas de pingüinos de Humboldt en Isla Cachagua, lo que coincide

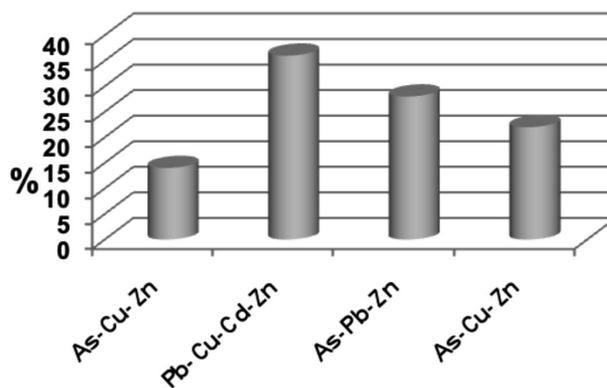


Figura 2. Porcentajes de ocurrencia de las resistencias a los metales en las cepas analizadas en Isla Cachagua.

con las mayores concentraciones de estos metales en las excretas recolectadas desde este lugar (Tabla III).

Discusión

No se encontraron estudios similares de susceptibilidad bacteriana a metales pesados en excretas de pingüinos. Más aún, poco se conoce acerca del impacto de la contaminación con metales sobre las poblaciones bacterianas en áreas donde habita el pingüino de Humboldt. Los diferentes valores de CMI encontrados sugieren que las bacterias son capaces de codificar complejos mecanismos de resistencia antimicrobiana, tales como enzimas hidrolíticas, bombas de flujo, mutaciones en porinas de membrana, biofilms y elementos genéticos móviles (Girlich *et al.*, 2007). Entre estos últimos están los plásmidos, los integrones, los transposones y elementos integrativos, los

cuales pueden transmitirse entre especies bacterianas mediante procesos de conjugación (Vargas *et al.*, 2010). Cuando un elemento móvil porta simultáneamente genes de resistencia a metales pesados y a algunos antibióticos, la presencia de metales pesados en el entorno claramente favorece la selección de dichos elementos genéticos en las poblaciones bacterianas (Mondaca *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2007). El presente estudio revela que existen bacterias gastrointestinales del pingüino de Humboldt resistentes a algunos de los metales pesados estudiados. Moraga *et al.* (2003) mostraron que bacterias del género *Pseudomonas* aisladas en muestras de agua de la bahía de Iquique (760km al norte de Isla Pan de Azúcar), con una gran actividad industrial en su borde costero y cuyas industrias descargan sus residuos líquidos en ella, son resistentes a Pb, As y Cu, y a cefataxima, amikacina,

TABLA II
CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI) DE METALES PESADOS PARA LAS BACTERIAS AISLADAS EN EXCRETAS DEL PINGÜINO DE HUMBOLDT EN TRES LOCALIDADES DE LA COSTA DE CHILE

Localidad	Bacterias aisladas	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) *				
		Pb	As	Cu	Zn	Cd
1	<i>Chryseobacterium indogenes</i>	800	1600	1600	>1600	200
	<i>Micrococcus luteus</i>	800	1600	800	>1600	100
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	1600	1600	400	>1600	>400
	<i>Erwinia</i> spp.	1600	1600	800	>1600	100
	<i>Pseudomonas</i> spp.	1600	1600	1600	>1600	>400
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1600	1600	400	>1600	200
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1600	1600	1600	>1600	>400
2	<i>Chryseobacterium indogenes</i>	800	800	400	>1600	100
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	800	800	400	>1600	100
	<i>Aerococcus viridans</i>	800	800	400	>1600	100
	<i>Weeksella virosa</i>	800	800	400	>1600	200
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	800	800	400	>1600	200
	<i>Gemella morbillorum</i>	800	800	400	>1600	200
	<i>Micrococcus luteus</i>	800	800	400	>1600	100
	<i>Pseudomonas</i> spp.	800	800	400	>1600	100
3	<i>Chryseobacterium indogenes</i>	>3200	>3200	1600	>1600	200
	<i>Enterococcus durans</i>	>3200	>3200	1600	>1600	>400
	<i>Enterococcus faecium</i>	>3200	>3200	1600	>1600	>400
	<i>Pseudomonas</i> spp.	>3200	>3200	1600	>1600	>400
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	>3200	>3200	1600	>1600	100
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	>3200	>3200	1600	>1600	>400

* Concentración mínima del metal que resultó inhibitoria para el crecimiento bacteriano. 1: Isla Pan de Azúcar, 2: Isla Chañaral, 3: Isla Cachagua.

TABLA III
CONCENTRACIONES MEDIAS DE METALES PESADOS* Y PORCENTAJE DE CEPAS RESISTENTES AISLADAS DESDE EXCRETAS DE PINGÜINOS DE HUMBOLDT OBTENIDAS EN ESTE ESTUDIO

Metales	Isla Pan de Azúcar		Isla Chañaral		Isla Cachagua	
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	%	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	%	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	%
Cu	148,8	43	69,6	0	199,7	100
As	1,9	100	0,4	0	7,9	100
Pb	1,8	71	1,6	0	12,8	100
Cd	47,7	43	21,2	0	42,5	67
Zn	487,1	100	222,5	100	0,8	100

* Reportadas por Celis *et al.* (2014); $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco.

nitrofurantoina y ampicilina. En el presente estudio, la mayoría de las bacterias aisladas mostraron resistencia a As, Cu, Pb y Zn. Todas las bacterias Gram negativas aisladas presentaron resistencia a penicilina y algunas a sulfatrimet. En general, las bacterias Gram negativas tales como *Chryseobacterium* y *Pseudomonas*, presentan resistencia innata a muchos antibióticos (Poole, 2005; Sakurada, 2008), pero no observamos ninguna resistencia a oxitetraciclina, gentamicina, florfenicol, amoxicilina, sulfatrimet o cefapirina.

Las mayores resistencias a Pb, Cu y As fueron observadas en isla Cachagua, la que a diferencia de las otras dos islas estudiadas es la que se encuentra más cercana al litoral y que está más afectada por actividades antropogénicas. Existen estudios que han establecido que la resistencia bacteriana a metales en ecosistemas muy contaminados está asociada a la resistencia a antibióticos (Baker-Austin *et al.*, 2006), como es el caso de la resistencia bacteriana al Hg (Summers *et al.*, 1993) y la resistencia de enterobacterias a la tetraciclina, aún a concentraciones sub-letales de As, Cu y Zn (Chen *et al.*, 2015). Por otro lado, la presencia de metales pesados en las excretas de aves árticas puede inducir cierta resistencia en bacterias que viven en ambientes terrestres (Sjölund *et al.*, 2008). Los trabajos llevados a cabo en suelos muy contaminados por la minería indican que ciertas bacterias nativas en suelos contaminados pueden desarrollar resistencia a Hg y otros metales pesados, así como también a cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, estreptomycin y kanamicina (Rojas *et al.*, 2014). Se ha encontrado que existe una amplia resistencia a Hg, Cu, Pb, Ni, Zn y antibióticos en bacterias que viven inmediatamente bajo la superficie de suelos contaminados (Diptendu y Goutam, 2013). No obstante, y dado que los pingüinos se alimentan en el mar, pueden transportar los metales pesados que ingieren a través de la dieta a los sitios

de anidación en tierra, actuando como biovectores de contaminación (Blais *et al.*, 2007). Es allí donde estos contaminantes se concentran, pudiendo aumentar la resistencia de ciertas comunidades bacterianas nativas de estos lugares terrestres. Las excretas son un sustrato ideal para el crecimiento microbiológico y constituyen un medio favorable para que las bacterias estén metabólicamente activas.

B. vesicularis es resistente a sulfametoxazol, trimetropina y ceftazidima (Zhang *et al.*, 2012) y también se ha reportado resistencia a vancomicina por parte de bacterias del género *Enterococcus* (Cetinkaya *et al.*, 2000). En aves, se ha encontrado que cepas de *Pseudomas* aisladas de la cloaca del perico bronceado (*Brotogeris jugularis*) y de cotorra (*Aratinga pertinax*) son resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, cefotaxima y ampicilina (Vargas *et al.*, 2010). Un gran número de bacilos no entéricos Gram negativos, como *Pseudomonas*, aislados de la cloaca de gaviota argétea (*Larus argentatus*) han mostrado resistencia a amikacina, ampicilina, aumentina, carbenicilina, celtiofur, tetraciclina, ticarcilina y tribrisen (Rose *et al.*, 2009). Otro estudio encontró que *M. haemolytica* es altamente resistente a penicilina y también a florfenicol (Pijoan y Aguilar, 2000). La administración de antibióticos de uso veterinario, como florfenicol, celtiofur o tribrisen, puede inducir la selección de bacterias resistentes a los antibióticos en la población animal, que después puede extenderse a los humanos a través de la cadena alimentaria. La fauna silvestre no se encuentra aislada de la cadena alimentaria y por ende muchos de los problemas en ganadería y clínica humana se están observando en estos animales (Van der Bogaard y Stobbering, 2000).

La resistencia a uno o a varios antibióticos en las bacterias aisladas en animales silvestres es un factor de riesgo para su salud (Vargas *et al.*, 2010). Adicionalmente, el uso

de antimicrobianos en la población humana y animal resulta en la liberación de residuos que portan tanto antibióticos como bacterias resistentes a ellos en los ambientes terrestres y marinos (Silbergeld *et al.*, 2008). En nuestro estudio es interesante notar que la mayor resistencia bacteriana se manifestó en los lugares donde hubo mayor concentración con metales pesados, lo que refuerza lo establecido por Montuelle *et al.* (1994), quienes indican que la resistencia de la flora microbiana depende de la concentración de estos elementos químicos en el ambiente. La Isla Cachagua está ubicada en una zona altamente industrializada y con asentamientos humanos, mientras que Isla Chañaral está alejada de las actividades humanas (Celis *et al.*, 2014). La liberación de As, Cu y Pb al ambiente es el resultado de diferentes actividades antropogénicas, y su presencia en el aire, agua y suelo se debe al uso de combustibles fósiles, a las fundiciones, al uso de pesticidas y fármacos, a las pinturas y a las maderas impregnadas que se usan en las viviendas (Duruibe *et al.*, 2007).

Existe evidencia de que las bacterias resistentes a antibióticos y metales viajan grandes distancias. En ambientes remotos, como el Ártico, se ha encontrado resistencia bacteriana a Hg, Cd, Pb, Cu y Zn, en sedimentos y agua, con una correlación positiva entre metales y antibióticos (Neethu *et al.*, 2015). Otro estudio encontró que bacterias aisladas de excretas de aves árticas presentaron resistencia a ampicilina, trimetropina, sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina (Sjölund *et al.*, 2008). En el norte y zona central de Chile, muchos de los vertidos al mar son aguas residuales industriales que pueden contener metales pesados (Salamanca *et al.*, 2004) y efluentes urbanos que pueden tener metales y compuestos farmacológicos (muchos de ellos conteniendo Hg) debido al aumento del consumo por la población humana y el uso en animales (Jones

et al., 2005; Heberer, 2002). En el litoral del norte y centro de Chile las corrientes oceánicas pueden movilizar los metales a grandes distancias (Celis *et al.*, 2014) y podrían llegar hacia los sitios de anidación de los pingüinos de Humboldt si las condiciones climáticas cambiaran, razón por la cual es preciso contar con un monitoreo continuo. La resistencia bacteriana en ecosistemas marinos y terrestres contaminados con metales como Hg, Cu, Pb, Ni y Zn (Rojas *et al.*, 2014; Ball *et al.*, 2007) significaría que la exposición microbiana a tales metales pesados podría resultar en una selección indirecta de bacterias con resistencia a múltiples antibióticos (Baker-Austin *et al.*, 2006; Seiler y Berendonk, 2012). Puesto que los metales pesados son todos similares en sus mecanismos de toxicidad, la tolerancia a múltiples metales es un fenómeno común entre las bacterias resistentes a metales (Rajbanshi, 2008). De esta manera, aunque en nuestro estudio no se pudo probar, la exposición a metales pesados podría estimular el desarrollo de cepas bacterianas nativas resistentes a antibióticos y viceversa si las condiciones cambiaran (Rojas *et al.*, 2014). Debido al cambio climático, los sistemas biofísicos y ecológicos están siendo alterados, y como consecuencia de ello se estima que habrá un aumento de las temperaturas en el norte y zona central de Chile (González *et al.*, 2009). Se sabe que las mayores temperaturas promueven la transmisión de patógenos (Patz *et al.*, 2005), lo cual implica que habrá una mayor presión sobre los ecosistemas terrestres y marinos del norte y centro del país. En esas condiciones, existe un escenario propicio para que muchas cepas nativas interactúen con las bacterias gastrointestinales que expulsa el pingüino de Humboldt cuando excreta en los lugares donde anida. El impacto que podrían tener las excretas de los pingüinos de Humboldt en los lugares donde estas aves anidan es un tema que requiere ser más investigado.

Conclusiones

Las cepas resistentes a metales pesados encontradas en este estudio podrían afectar los ciclos orgánicos e inorgánicos en los ambientes del litoral septentrional y central de Chile. A pesar de que no se encontraron evidencias que indiquen que la resistencia bacteriana a metales en los lugares estudiados está fuertemente asociada a la resistencia a antibióticos, se notó cierta tendencia. En general, las cepas bacterianas aisladas de las excretas de pingüino presentan una mayor resistencia a metales pesados en los sectores que se encuentran más cercanos al litoral, los cuales presentan los niveles más elevados de metales pesados como consecuencia de las diferentes actividades antropogénicas. Esto permite localizar las zonas donde las actividades humanas impactan mayormente sobre estas especies de aves marinas, lo que sería un aporte para evaluar el grado de contaminación debida a la actividad antropogénica y que podría estar afectando a la fauna del litoral y la salud humana, y ayudará a la toma de decisiones adecuadas que apunten a la reducción de las sustancias contaminantes en el ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Concepción, a través del proyecto 214.074.051-1.0. Los autores agradecen la colaboración del personal de la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y del Servicio Nacional de Pesca (SERNA-PESCA) para la obtención de los permisos para la toma de datos en terreno.

REFERENCIAS

Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T (2007) Zoo animals as reservoirs of Gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6686-6690.

- Alonso A, Sánchez P, Martínez JL (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3: 1-9.
- Anisimova L, Siunova T, Boronin A (1993) Resistance to metals gram negative bacteria isolated from sewage and soils of industrial regions. *Microbiology* 62: 505-508.
- Ball M, Carrero P, Castro D, Yarzabal A (2007) Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). *Curr. Microbiol.* 54: 149-154.
- Baker-Austin C, Wright M, Stepanauskas R, McArthur J (2006) Co-selection of antibiotics and metals resistance. *Trends Microbiol.* 14: 176-182.
- Blais J, Macdonald R, Mackey D, Webster E, Harvey C, Smol J (2007) Biologically mediated transport of contaminants to aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 41: 1075-1084.
- Celis JE, Espejo W, González-Acuña D, Jara S, Barra R (2014) Assessment of trace metals and porphyrins in excreta of Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in different locations of the northern coast of Chile. *Environ. Monit. Assess.* 186: 1815-1824.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG (2000) Vancomycin-resistant Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686-707.
- Chen S, Li X, Sun G, Zhang Y, Su J, Ye J (2015) Heavy metal induced antibiotic resistance in bacterium LSJC7. *Int. J. Molec. Sci.* 16: 23390-23404; doi:10.3390/ijms161023390.
- Diptendu S, Goutam P (2013) Molecular characterization of metal and antibiotic resistance activities in a bacterial population isolated from waste water sample. *Int. J. Biotechnol. Bioeng. Res.* 4: 21-30.
- Duruibe J, Ogwuegbu M, Egwurugwu J (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.* 2: 112-118.
- Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, Nordmann P (2007) Extended spectrum beta lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4681-4685.
- González S, Salazar F, Neuenchwander A, Arata P, Tessada R, Salas C, Searle JP (2009) Inventarios anuales de gases de efecto invernadero de Chile. Santiago, Chile. <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR35866.pdf>
- Heberer T (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131: 5-17.
- Jones O, Lester J, Voulvoulis N (2005) Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol.* 23: 163-167.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-994.
- Martínez D, González G (2004) *Las Aves de Chile: Nueva Guía de Campo*. Ediciones del Naturalista. Santiago, Chile. 620 pp.
- Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G (2013) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: O255-O266.
- Meza J, Simeone A, García M, Monsalve B (1998) *Censos de Pingüino de Humboldt (Spheniscus humboldti) en el Monumento Natural Isla Cachagua y Santuario de la Naturaleza Islotte Pájaro Niño, 1990-1997*. Boletín Técnico 66. Corporación Nacional Forestal. Santiago, Chile.
- Mondaca M, Abarzúa M, Paredes K, Maugeri T, Martínez M (1993) Transferencia de resistencia a metales pesados en bacterias aisladas del río Bio Bio, VII Región, Chile. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 35: 39-43.
- Monge-Amaya O, Valenzuela-García J, Acedo-Félix E, Certucha-Barragán M, Almedáriz-Tapia F (2008) Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). *Rev. Int. Contam. Amb.* 24: 107-115.
- Montuelle B, Latour X, Volat B, Gounet A (1994) Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 753-758.
- Moraga R, Merino C, Mondaca MA (2003) Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Inv. Mar.* 31: 91-95.
- Muñoz J, Becker PH (1999) The Kelp Gull as bioindicator of environmental chemicals in the Magellan region. A comparison with other coastal sites in Chile. *Sci. Mar.* 63: 495-502.
- Neethu C, Mujeeb K, Saramma A, Mohamed A (2015) Heavy-metal resistance in gram-negative bacteria isolated from Kongsfjord, Arctic. *Can. J. Microbiol.* 61: 429-435.
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 313-339.
- Pathak S, Gopa K (2005) Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environ. Res.* 98: 100-103.
- Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA (2005) Impact of regional climate change on human health. *Nature* 438: 310-317.
- Piñero P, Aguilar F (2000) Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana. *Vet. Méx.* 31: 153-156.
- Poole K (2005) *Pseudomonas aeruginosa*. En *Frontiers in Antimicrobial Resistance: A Tribute to Stuart B. Levy*. ASM Press. Washington, DC, EEUU. pp. 355-366.
- Rajbanshi A (2008) Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. *Our Nat.* 6: 52-57.
- Rojas M, Botello W, Ball M (2014) Resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias aisladas de subsuelo en la región El Callao, Venezuela. *Rev. Col. Biotechnol.* 16: 141-149.
- Rose JM, Gast RJ, Bogomolni A, Ellis JC, Lentell BJ, Touhey K, Moore M (2009) Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67: 421-431.
- Sakurada A (2008) *Chryseobacterium indologenes*. *Rev. Chil. Infectol.* 25: 446.
- Salamanca M, Jara B, Rodríguez T (2004) Niveles de Cu, Pb y Zn en aguas y *Perumytilus purpuratus* en Bahía San Jorge, norte de Chile. *Gayana* 68: 53-62.
- Seiler C, Berendonk T (2012) Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3: 399.
- Silbergeld EK, Graham J, Price LB (2008) Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health* 29: 151-169.
- Singer R, Ward MP, Maldonado G (2006) Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 943-952.
- Sjölund M, Bonnedahl J, Hernandez J, Bengtsson S, Cederbrant G,

- Pinhassi J, Kahlmeter G, Olsen B (2008) Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 70-72.
- Summers AO (2002) Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin. Infect. Dis.* 34: S85-S92.
- Summers AO, Wireman J, Vimy MJ, Lorscheider FL, Marshall B, Levy SB, Bennett S, Billard L (1993) Mercury released from dental silver fillings provokes an increase in mercury-resistant and antibiotic resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 825-834.
- Van der Bogaard A, Stobbering E (2000) Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 327-335.
- Vargas J, Máttar S, Monsalve S (2010) Bacterias patógenas con alta resistencia a antibióticos: estudio sobre reservorios bacterianos en animales cautivos en el zoológico de Barranquilla. *Infectio* 14: 6-19.
- Vermeer K, Castilla JC (1991) High cadmium residues observed during a pilot study in shorebirds and their prey downstream from the El Salvador cooper mine, Chile. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 242-258.
- Zhang C, Hsu H, Li C (2012) Brevundimonas vesicularis bacteremia resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime in a tertiary hospital in southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 45: 448-452.