

Comportamiento *in vitro* de *Escherichia coli* enterotoxigénica ante concentraciones crecientes de cobre

Guillermo Barreto Argilagos*; Herlinda de la Caridad Rodríguez Torrens**; Herlinda de la Caridad Barreto Rodríguez***

* Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey, Cuba

** Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey, Cuba

*** Universidad de Ciencias Médicas Carlos Juan Finlay, Camagüey, Cuba

guillermo.barreto@reduc.edu.cu

RESUMEN

El sulfato cúprico tiene una gran utilización como promotor de crecimiento en las producciones porcinas pese a los riesgos ecológicos que presupone. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el comportamiento *in vitro* de *Escherichia coli* enterotoxigénica ante concentraciones crecientes de cobre. A tal fin se emplearon seis cepas, dos de referencia: A-1 (O149: K91: K88ac) y E68-I (O141: K85: K88ab), junto a cuatro aisladas de crías con colibacilosis. Las mismas se crecieron en agar Mueller-Hinton acorde a la técnica de gradientes de concentraciones en rangos que se elevaron semanalmente desde un mínimo de 5 hasta un máximo de 50 mg/mL de CuSO₄. La experiencia duró tres semanas. Aunque en los contactos iniciales hubo una mejor adaptación en dos de las cepas salvajes, al final todas desarrollaron una elevada tolerancia al metal. En el caso de A-1 la misma puede estar determinada por la formación de biofilm, fenómeno que, además de la resistencia señalada, constituye un importante factor de virulencia en los procesos infectivos bacterianos. Los resultados obtenidos constituyen otro elemento a sumar en la lista de peligros inherentes al uso de estas sales como promotores de crecimiento en las producciones porcinas.

Palabras clave: antimicrobianos; entorno; promotores de crecimiento; porcino; tolerancia

In vitro Behavior of Enterotoxigenic *Escherichia coli* to Increasing Copper Concentrations

ABSTRACT

Cupric sulfate has been used as growth promoter in swine productions for a long time instead of the ecological risks involved. The aim of this paper was evaluating the *in vitro* behavior of enterotoxigenic *Escherichia coli* to increasing concentrations of copper. Six strains and two of references were used A-1 (O149: K91: K88ac) and E68-I (O141: K85: K88ab), and four isolated from calves with colibacilosis. This strain were cultivated on Mueller-Hinton Agar plates following the gradient concentration technique with ranges increased weekly from 5 till 50 mg/mL of CuSO₄. The experiment lasted three weeks. All strains developed a high metal tolerance, although there was a better fit in the initial contacts in two of the wild strains. Tolerance in A-1 case may be determined by biofilm formation; this phenomenon is an important virulence factor in bacterial infectious processes and it's another trait to be considered by producers when salts of this metal are used as growth promoters.

Key words: antimicrobials, environment, growth promoters, swine, tolerance

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción porcina contemporáneos han logrado niveles de eficiencia solamente posibles con el empleo de estimuladores del crecimiento (Davies, 2011). El uso de sulfato cúprico, a tal fin, data de mediados del siglo XX. Su efectividad se ha asociado a la acción antagónica del aditivo sobre enteropatógenos como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) y *Salmonella*, entre otros. Durante años la única preocupación radicaba en la toxicidad del catión (Hastad *et al.*, 2001). Luego se constató que tenía implicaciones ecológicas pues las heces de los animales tratados contenían concentraciones de cobre 14 veces superiores a las de los que no lo consumían y su acumulación ejercía una acción negativa en los suelos. De mantenerse esta práctica, de acuerdo a modelos predictivos, en un lapso de 10 a 50 años las concentraciones del metal en este medio excederá los límites permisibles (Seiler y Berendonk, 2012).

La colibacilosis es una de las principales causas de mortalidad y pérdidas económicas en las producciones porcinas (Barreto et al., 2015). *E. coli*, a lo largo de los años ha mostrado una sorprendente habilidad para adaptarse a los ambientes más adversos, incluidos aquellos con concentraciones elevadas de metales pesados (Barreto y Rodríguez, 2009); este fenómeno, de por sí preocupante, cobra una mayor dimensión cuando a ello se añade que estas cepas, aparejada a su resistencia a tales cationes, por lo general exhiben un arsenal de factores de virulencia más amplio y por ende, sus potencialidades para desarrollar enfermedades en los hospederos susceptibles se incrementan de forma notable (Barreto y Rodríguez, 2009).

Esta investigación tuvo como objetivo estudiar el comportamiento *in vitro* de *Escherichia coli* enterotoxigénica ante concentraciones crecientes de cobre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Se utilizaron seis cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ECET), dos de referencia: *Escherichia coli* A-1 (O149: K91: K88ac) y *Escherichia coli* E68-I (O141: K85: K88ab) y cuatro aisladas de cerdos, previo al destete, con colibacilosis que se identificaron con la sigla CS (cepa salvaje) y un número del 1 al 4. Hasta el momento de su utilización todas se conservaron en caldo Mueller-Hinton glicerinado (30 %) a - 8 °C.

Comportamiento de ECET ante concentraciones crecientes de CuSO_4

Se prepararon placas de Petri standard con agar Mueller-Hinton acorde a la variante de gradientes de concentraciones (Karadjov, 1985) con rangos de 5-25; 10-30 y 15-50 mg/mL de la sal para las siembras correspondientes a la primera, segunda y tercera semana, respectivamente. Luego de realizada en línea recta (de menor a mayor concentración), se incubó a 37° C (de 24 a 48 h en los primeros cultivos; 24 h el resto de la experiencia) hasta obtener crecimientos, a partir de los cuales, tomando con asa de la zona de mayor concentración en cobre, se realizaron nuevos subcultivos en la forma descrita. Al final de cada semana se tomaron fotos como evidencias del resultado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento inicial de las bacterias ante el contacto con Cu^{2+} fue variable: las cepas salvajes CS1 y CS2 mostraron un crecimiento adecuado, en particular la primera, desde los primeros contactos con el metal. Posteriormente, en la medida que se repitieron los subcultivos, todas incrementaron su acercamiento a las regiones de máxima concentración de CuSO_4 en la placa, y el crecimiento, en torno a la línea de siembra, se hizo más exuberante (Fig. 1).

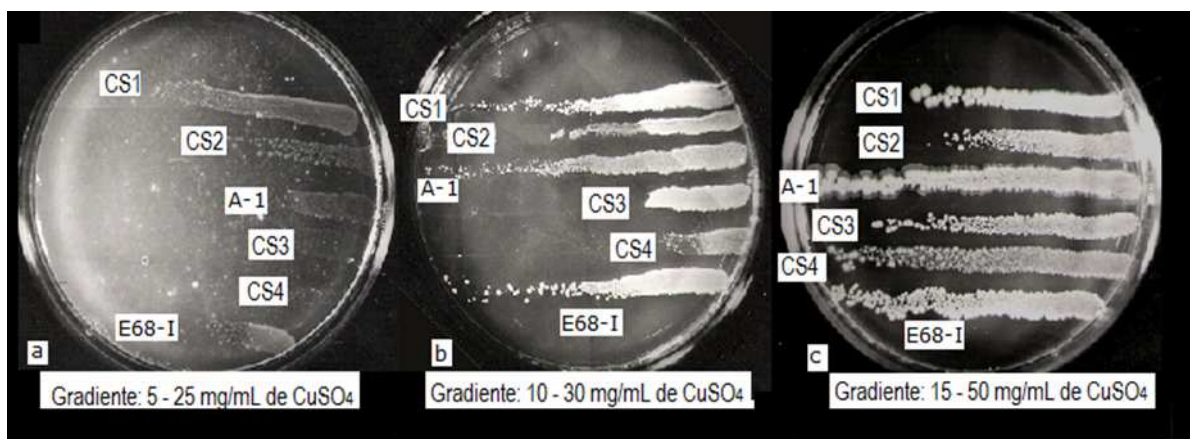


Fig. 1 Imágenes de los crecimientos de seis cepas de *E. coli* a gradientes crecientes de CuSO_4 al finalizar la primera (a), segunda (b) y tercera (c) semana de enfrentamiento. La prolongación del contacto conlleva a un acercamiento creciente a las zonas de mayor concentración del catión (extremo izquierdo de la placa), también a una mayor exuberancia del crecimiento a lo largo de la línea de siembra.

Tanto *E. coli* A-1, como su homóloga E68-I, luego de su caracterización como cepas de referencia, se han mantenido en ambientes de laboratorio ajenas al contacto con antimicrobianos de todo tipo. Las cepas salvajes (CS) en su totalidad proceden de crías con colibacilosis. En las unidades donde se realizaron los aislamientos durante años se ha añadido al pienso CuSO_4 en las proporciones sugeridas para que actúe como promotor de crecimiento (Macías *et al.*, 2015).

Lo antes expuesto puede haber influido en cuanto a las diferencias en la intensidad del crecimiento durante la primera semana de contacto con el metal en estudio. A lo largo de la evolución del planeta, las bacterias, primeras pobladoras, debieron adaptarse a la presencia de una multitud de cationes en los diversos medios naturales, a través de un proceso de mutación-selección constante que sólo dio posibilidades de supervivencia a las más adaptables (Barreto y Rodríguez, 2006). La información para resistencia adquirida de esta forma puede radicar en plásmidos que persisten mientras las bacterias que los portan se desarrollen en medios donde está presente el metal, no así cuando falta. Por ejemplo, al someterlas a pases sucesivos por medios de cultivos convencionales para su mantenimiento tienden a perder dichos plásmidos (Barreto, 1988a). Esto es justamente lo asumible con las cepas referentes; en el caso de CS3 y CS4 pudo deberse a la ausencia de contactos anteriores con el cobre. En tanto, la conducta de CS1, y en menor grado CS2, corresponde a bacterias con mecanismos activos de resistencia al metal, evidencia de su presencia en ese entorno.

En los últimos cien años, debido a la industrialización y a las tecnologías para incrementar los rendimientos en la agricultura, la ganadería y la acuicultura, los niveles de contaminación con metales como Hg, Cd, Cu y Zn se han disparado a valores sorprendentes por lo que las microbiotas, muy en especial la de los suelos, han tenido que afrontar un desafío mayor a los sobrellevados en la historia terrícola precedente (Barreto y Rodríguez, 2010; Seiler y Berendonk, 2012). Producto de entornos de este tipo surgen bacterias con un proceder acorde al desarrollado por CS1 y CS2.

El crecimiento de las bacterias, captado en imágenes al final de las semanas dos y tres, en particular esta última (Fig. 1 b y c) evidencia una adaptación al antimicrobiano, expresada en la exuberancia en torno a la línea de siembra. La tolerancia a los metales se incrementa en la medida que se prolonga el contacto bacteriano con estos, pues en el tiempo se van activando genes de respuesta a estrés y de resistencia (Harrison *et al.*, 2007). Estos genes pueden estar ubicados en plásmidos o en el nucleóide, también denominado cromosoma bacteriano; gran parte de las investigaciones testimonian el predominio de los primeros en cuanto se refiere a la resistencia frente al Cu, lo cual no obvia la participación de los segundos, como propone la revisión realizada por Cooksey (2006).

En los resultados puede haber influido cualquiera de las variantes mencionadas, aunque en una experiencia anterior, que involucró a cepas atípicas de *E. coli* productoras de H_2S resistentes a CuSO_4 y al antibiótico Apramicina (también conocido como Nebramycin II o Apralan), la tolerancia a ambos antimicrobianos estaba regulada por un plásmido que se perdía cuando dichas bacterias se sometían a subcultivos sucesivos en medios de cultivos carentes del metal y el antibiótico, no así cuando al menos uno de los dos estaba presente (Barreto, 1988b).

Para evitar el daño celular ante la presencia de antimicrobianos, cada vez más frecuentes en la naturaleza contemporánea, las bacterias han desarrollado mecanismos de tolerancia; hay tres que explican su resistencia a metales pesados:

1. *Formación de complejos.* Una vez “atrapado” el metal, la concentración de iones libres en el citoplasma es mínima, muy inferior al nivel letal. Esta opción está relacionada con el incremento en la producción de biofilms ante estos elementos, pues es en este mucílago donde ocurre la mayor fijación (Harrison *et al.*, 2007; Barreto y Rodríguez, 2010). En el caso de *E. coli* A-1 (Fig. 2), durante su tercera semana de exposición a Cu^{2+} , se aprecia, en torno a la línea de crecimiento, un área difusa correspondiente a la acumulación de exopolisacáridos (EPS) mucilaginosos, característicos de los biofilm, una opción extrema para contrarrestar la elevadísima concentración de este metal tan tóxico (Harrison *et al.*, 2007; Barreto y Rodríguez, 2010).

2. *Reducción de la concentración intracelular de iones.* Un ejemplo lo constituye la producción, en bacterias gramnegativas, de mercurio-reductasa, capaz de reducir Hg^{2+} , muy tóxico, a Hg^0 , menos severo y que la célula elimina fácilmente por su bajo punto de evaporación (Seiler y Berendonk, 2012).



Fig. 2. Formación de exopolisacáridos en torno al crecimiento de A-1. La zona mucoide se incrementa a medida que aumenta la concentración del cobre.

3. *Mecanismos de eflujo.* Muy comunes en bacterias gramnegativas, y que les permiten la extrusión de metales desde el citoplasma, a través de la membrana interna y la externa, hasta el entorno circundante (Seiler y Berendonk, 2012). En el caso analizado constituye una opción muy probable desde el punto de vista teórico, pero carente de confirmación.

Lo evidente es que, el contacto sucesivo con el catión Cu^{2+} desencadena respuestas en las cepas estudiadas que les permite tolerar altas concentraciones de este; una de ellas la producción de biofilms, apreciable en el caso de la cepa A-1. Este resultado, en general, tiene implicaciones que van más allá de la resistencia a este metal pesado. Es un hecho probado que la presencia de metales pesados en los medios naturales promueve la co-selección de bacterias resistentes a estos, que a la vez resultan tolerantes a determinados antibióticos, aunque estos últimos no estén presentes (Seiler y Berendonk, 2012). Por su parte, esta resistencia a los antimicrobianos y la virulencia constituyen mecanismos que juegan un papel decisivo en el establecimiento de las infecciones bacterianas; ambos factores favorecidos en grado superlativo cuando hay formación de biofilms (Reis *et al.*, 2014). En el caso particular de *E. coli* se ha notificado la existencia de correlación entre la existencia de factores de virulencia y la producción de biofilm (Naves *et al.*, 2008).

Si bien las producciones animales contemporáneas, en aras de mantener la productividad, requieren de opciones como la analizada, no se puede olvidar que existen otras menos agresivas a las especies de destino, los consumidores y el entorno, como son el empleo de: prebióticos, probióticos y microorganismos eficientes (Rodríguez *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

La exposición *in vitro* de *Escherichia coli* a concentraciones crecientes de $CuSO_4$ induce resistencia a este metal, aún a elevadas concentraciones. Dos de las cepas salvajes, desde el primer enfrentamiento, crecieron sin dificultad, evidencia de contacto anteriores con el catión en condiciones naturales. La produc-

ción de biofilm es uno de los mecanismos involucrados en la tolerancia, dado su papel como importante factor de virulencia en la colibacilosis, y otras enfermedades de etiología bacteriana, lo demostrado constituye un elemento más a considerar en las producciones porcinas que emplean esta sal como promotor de crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. C. Nelson Izquierdo Pérez, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por su auxilio en el escaneo de las fotografías utilizadas en el artículo.

REFERENCIAS

- BARRETO, G. (1988a). Factores de adhesión en *E. coli* mediante cuatro métodos de diagnóstico. *Rev. Prod. Anim.*, 4, 209-213.
- BARRETO, G. (1988b). Una gran resistencia al antibiótico Aphramicyn en cepas de *E. coli* productoras de sulfuro de hidrógeno. *Rev. Prod. Anim.*, 4, 261-263.
- BARRETO, G. y RODRÍGUEZ, H. (2006). *Impacto del entorno en la virulencia bacteriana*. Extraído el 9 de enero de 2015, desde <http://www.monografias.com/trabajos37/virulencia-bacteriana/virulencia-bacteriana.2.shtml>.
- BARRETO, G. y RODRÍGUEZ, H. (2009). La cápsula bacteriana, algo más que una estructura no esencial (Revisión). *Rev. Prod. Anim.*; 21 (1), 69-80.
- BARRETO, G. y RODRÍGUEZ, H. (2010). Biofilms bacterianos versus antimicrobianos. Nutracéuticos: una opción promisoriosa (Artículo de revisión). *Rev. prod. Anim.*, 22 (1), 20-30.
- BARRETO, G.; RODRÍGUEZ, H.; BERTOT, J. A. y DELGADO, R. (2015). Microorganismos autóctonos multipropósitos (MAM) para el control y prevención de la colibacilosis neonatal porcina. *Rev. Prod. Anim.*, 27 (2), 16-19.
- COOKSEY, D. A. (2006). Copper Uptake and Resistance in Bacteria. *Molecular Microbiology*, 7, 1-5.
- MINSAP (2006). *Formulario nacional de medicamentos*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- DAVIES, P. R. (2011). Intensive Swine Production and Pork Safety. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (2), 189-201.
- HARRISON, J. J.; CERI, H. Y TURNER, R. J. (2007). Multimetal Resistance and Tolerance in Microbial Biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5 (12), 928-938.
- HASTAD, C. W.; NELSEN, J. L.; TOKACH, MICHAEL, D.; GOODBAND, R. D.; DRITZ, S. S. (2001). Evaluation of Different Copper Sources as a Growth Promoter in Swine Finishing Diets. *Swine Day*, 01, 111-117.
- KARADJOV, J. (1985). Formation of an Exopolysaccharide Capsular Layer on the Surface of Some Bacteria Under the Influence of Pesticides and Heavy Metals. *Cmtes rendus de l' Académie Bulgare des Sciences*, 38, 223-225.
- MACÍAS, M.; DOMÍNGUEZ, P. L.; ABELEDO, C. M.; SOSA, R.; GARCÍA, A.; CRUZ, E. *et al.* (2015). *Manual de procedimientos técnicos para la crianza porcina*. La Habana, Cuba: EDIPORC- Instituto de Investigaciones porcinas.
- NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J. *et al.* (2008). Correlation between Virulence Factors and *In Vitro* Biofilm Formation by *Escherichia coli* Strains. *Microbial Pathogenesis*, 45 (2), 86-91.
- REIS, A. C. M.; SILVA, J. O.; LARANJEIRA, B. J.; PINHEIRO, A. Q. y CARVALHO, C. B. M. (2014). Virulence Factors and Biofilm Production by Isolates of *Bacteroides fragilis* Recovered from Dog Intestinal Tracts. *Braz. J. Microbiol.*, 45 (2). Extraído el 9 de enero de 2015, desde <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000200037>
- RODRÍGUEZ, H.; BARRETO, G.; BERTOT, J. y VÁZQUEZ, R. (2013). Microorganismos eficientes como promotores del crecimiento en cerdos hasta el destete. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 14 (9). Extraído el 9 de enero de 2015, desde <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090913.html>. [Consultado el 15 de marzo de 2015].
- SEILER, C. y BERENDONK, T. U. (2012). Heavy Metal Driven Co-Selection of Antibiotic Resistance in Soil and Water Bodies Impacted by Agriculture and Aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 14 (3), 399. Extraído el 9 de enero de 2016, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23248620>.

Recibido: 22-9-2015

Aceptado: 1-10-2015