

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



TITULO:

Efecto de la concentración de clortetraciclina en la selección de resistencia en microbiota aeróbica heterotrófica de agua de río

Tesis de Magíster presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias, mención Microbiología

Por

Jeannette Alejandra Muñoz Aguayo

2007

RESUMEN

Miles de compuestos farmacéuticos se utilizan cada año en el mundo, dentro de los cuales destacan los antibióticos, compuestos destinados a prevenir y tratar enfermedades infecciosas en humanos y animales. Actualmente, también se utilizan en agricultura y ganadería. En general, luego de ser utilizados, estos compuestos son liberados al ambiente, muchas veces sin un previo tratamiento, generando riesgos para la salud humana y animal, debido a su actividad en la selección de bacterias resistentes a estas sustancias. A pesar de lo anterior, muy poco se conoce acerca de los efectos de concentraciones ambientales de antibióticos sobre todo con respecto a la resistencia bacteriana. En esta tesis se estudió la correlación entre el uso del antibiótico clortetraciclina y la selección de bacterias resistentes en microbiota aeróbica heterotrófica de agua de río, para lo cual se emplearon 3 quimiostatos conteniendo agua de río. Uno de los quimiostatos fue utilizado como control y los otros dos fueron inoculados con clortetraciclina a concentraciones finales de 8 $\mu\text{g/L}$ y 800 ó 32.000 $\mu\text{g/L}$. La concentración de clortetraciclina presente en las muestras fue cuantificada mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Del análisis de concentración de clortetraciclina de la muestra de agua de río original sólo en dos de los experimentos analizados, el valor de concentración del antibiótico fue menor que el límite de detección proporcionado por el sistema de detección (0,05 $\mu\text{g/L}$) y los valores cuantificados mediante esta técnica en los cuatro experimentos desde las muestras provenientes de los reactores fueron cercanos a la concentración aplicada dentro

del bioreactor. En los cuatro experimentos la concentración de antibiótico fue menor en la mañana antes de aplicar el antibiótico por primera vez decreciendo a través del tiempo. El mayor valor de cuantificación de antibiótico se presenta en el experimento 1 con 13,92 $\mu\text{g/L}$ de clortetraciclina.

Por otra parte, se determinó el número de bacterias cultivables mediante recuento en placa, desde la muestra original y diariamente desde el día 0 a 10 del experimento desde los bioreactores en placas de agar LB diluido 1/10 y en placas de agar LB diluido 1/10 adicionado de clortetraciclina a concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$. De esta determinación se obtuvo que el recuento de bacterias cultivables en placas de LB no cambió significativamente desde el inicio de la experiencia en cada uno de los 6 experimentos. El recuento de bacterias cultivables en placas de LB+ clortetraciclina en el experimento 1 fue mayor en el bioreactor con 32.000 $\mu\text{g/L}$ con diferencias de entre 2 a 3 Log desde el día 3 del experimento, lo cual también se observó en el experimento 2. El recuento del control y el bioreactor con 8 $\mu\text{g/L}$ de clortetraciclina fue similar con valores de $5,1 \times 10^4$ y 2×10^4 UFC/ml en el día 0 del experimento, respectivamente y $2,4 \times 10^6$ y 2×10^7 UFC/ml en el día 10 del experimento, respectivamente.

En el experimento 3 el recuento en placas de LB+ clortetraciclina fue semejante en los bioreactores control y con 800 $\mu\text{g/L}$. En las placas de LB suplementadas con 16 $\mu\text{g/ml}$ de CTC el recuento del número de bacterias en los bioreactores control y con 8 $\mu\text{g/L}$ fue similar, con valores promedios de $2,4 \times 10^4$ y $2,6 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente, en el día 0 del experimento y de $5,5 \times 10^5$ y $1,3 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente, en el día 10 del experimento y los valores registrados del recuento en el bioreactor con 800 $\mu\text{g/L}$ fueron

mayores, siendo más altos el día 7 del experimento con un valor de $1,6 \times 10^8$ UFC/ml, para el experimento 4. En los experimentos 5 y 6 el recuento en placas de LB+clortetraciclina también fueron similares en los bioreactores control y con 8 ug/L.

De los resultados del recuento de bacterias cultivables en placas de LB+clortetraciclina y del análisis estadístico, se deduce que existe diferencia significativa entre los grupos ($P \leq 0,05$) y experimento ($P \leq 0,05$) entre los bioreactores control, 8 $\mu\text{g/L}$ y 800 $\mu\text{g/L}$ durante los 4 experimentos en el recuento de bacterias cultivables que crecieron en placas de agar LB+CTC; en cambio, el recuento de bacterias cultivables durante los 6 experimentos entre los bioreactores control y 8 $\mu\text{g/L}$ que crecieron en placas de agar LB+CTC, no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

Además, se detectó la presencia de genes *tet* en DNA total extraído de las poblaciones bacterianas presentes en los bioreactores, mediante PCR. El bioreactor control presentó una distribución similar de genes *tet* a la encontrada en los bioreactores a los cuales se añadió antibiótico. Los genes detectados fueron *tet A*, *tet B*, *tet C*, *tet D*, *tet E*, *tet M*, *tet S* y *tet L*. El gen *tet Q* no fue detectado en ninguno de los experimentos realizados y el gen *tet A* fue el más frecuentemente encontrado.

Estos resultados confirman que bajas concentraciones del antibiótico clortetraciclina no selecciona para resistencia en microbiota aeróbica heterotrófica de agua de río dando cuenta que la selección de resistencia no estaría favorecida por las bajas concentraciones de antibióticos estudiadas.