

Capítulo 4.

Resistencia–Susceptibilidad al cobre de aislamientos bacterianos asociados al cáncer bacterial

María Francisca Beltrán G.

Ingeniera en Biotecnología Vegetal, M. S
Biotecnóloga/ INIA Rayentué
francisca.beltran@inia.cl

Boris Sagredo D.

Bioquímico. Biólogo Celular y Molecular, Ph. D.
Biotecnólogo/ INIA Rayentué
bsagredo@inia.cl

Paz Millas O.

Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.
Fitopatóloga/ INIA Quilamapu
pmillas@inia.cl

Andrés France I.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.
Fitopatólogo/ INIA Quilamapu
afrance@inia.cl

Actualmente existen alrededor de 33 productos registrados en el Servicio Agrícola y Ganadero para control de cáncer bacterial en cerezo, la composición de estos plaguicidas se basa principalmente en compuestos que tienen cobre, que representan más del 80 % de los productos con autorización vigente (www.sag.gob.cl, marzo 2020); siendo 24 productos basados en cobre, cinco basado en microorganismos, y otros cuatro productos que incluyen un antibiótico.

Los principios activos de estas formulaciones pertenecen a una clase general de productos conocidos como compuestos antimicrobianos basados en cobre (CABC), que no sólo se utilizan como protectores de contacto para el control del cáncer bacterial, también se usan por su efecto biocida de amplio espectro para controlar otros patógenos de plantas, entre los que se incluyen: bacterias, hongos, oomicetes. Así en muchas zonas agrícolas donde se han utilizado

intensivamente estos CABC se advierten complicaciones para la salud humana y la biodiversidad, donde la fitotoxicidad y el desarrollo de cepas bacterianas resistentes al cobre son los problemas más conocidos.

En el marco del proyecto FIC Regional “Transferencia Control Cáncer Bacteriano en Huertos de Cerezos” se estudió la resistencia/susceptibilidad al cobre de 80 aislamientos bacterianos obtenidos de 10 comunas de la Región de O’Higgins, asociados al cáncer bacterial en cerezo. Se evaluó la resistencia a Cu^{+2} basados en el ensayo descrito por Cazorla et al. (2002) que utiliza distintas concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) entre 0,0 y 3,6 mM (0 y 225 ppm). Un aislamiento que crece a concentraciones menor o igual que 0,8 mM se considera sensible y aquellos que logran crecer a concentración mayor que 0,8 mM se califican como resistentes al sulfato de cobre. En la Figura 1 se ejemplifica resultados contrastantes en tres cepas. Para corroborar los resultados de desarrollo de colonias bacterianas en placas, se evaluó la presencia de los genes del operón cop (copABCD), que están asociados al mecanismo más frecuente de resistencia al cobre en bacterias. La acción de estos genes permite compartimentar y posteriormente eliminar el Cu^{+2} de la célula bacteriana.

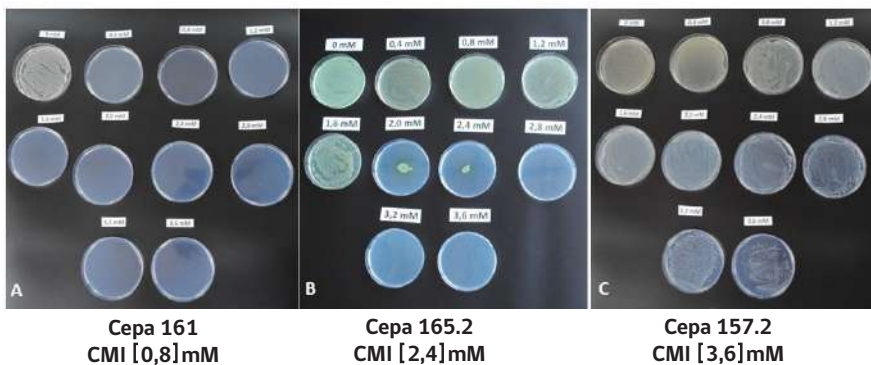


Figura 1. Evaluación de crecimiento bacteriano y concentración mínima inhibitoria (CMI) de sulfato de cobre en medio manitol–glutamato– extracto de levadura (MGY). Fotos tomadas luego de 72 horas de incubación en estufa a 26 °C.

Los resultados indicaron que un 80% de los aislamientos evaluados presentaron un alto grado de resistencia al sulfato de cobre, con valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre 0,8–3,6 mM (equivalente a 50 - 225 ppm de cobre), como muestra la Figura 2. En la mayoría de los casos la resistencia se correlaciona con la existencia de determinantes génicos pertenecientes al

operón copABCD. Un grupo de 12 aislamientos correspondieron al agente causal del cáncer bacterial: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Los altos niveles de resistencia al Cu^{+2} de las comunidades bacterianas asociadas al cáncer bacterial, incluidos los del agente causal, nos debería hacer dudar sobre la efectividad de los productos CABC en el control de la enfermedad.

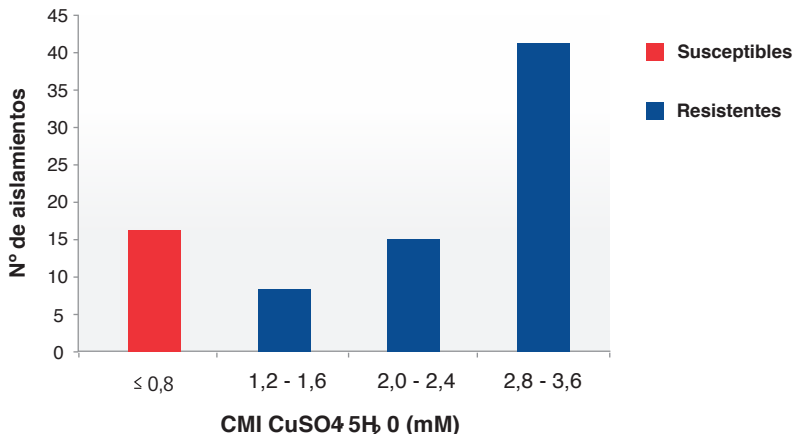


Figura 2. Gráfico de frecuencia de aislamientos sensibles y resistentes según concentración mínima inhibitoria al sulfato de cobre.

Suelos de la Región de O'Higgins presentan altas concentraciones de cobre

Un estudio previo realizado en la Región de O'Higgins (Burgos, 2017) evidenció altas concentraciones de Cobre (Cu) en el suelo, con un promedio de 176 mg kg^{-1} (50 puntos muestreados). En la Figura 3, se puede apreciar que los niveles de Cu tienden a aumentar hacia la zona de la Cuenca de Rancagua, incluyendo dos sitios al suroeste de esta ciudad con niveles superiores al resto de la Región, donde los niveles pueden alcanzar los 675 mg kg^{-1} de cobre. Cabe destacar que la extensa zona que cubre la franja de color amarillo ($86,3 - 294 \text{ mg kg}^{-1}$), además de los territorios de color naranja y naranja oscuro, equivalen a concentraciones entre 294 y 675 mg kg^{-1} . Por lo tanto, gran parte del área en estudio presentaría concentraciones que podrían considerarse como suelos contaminados por cobre (Burgos, 2017). Estos suelos corresponden principalmente a zonas de cultivos anuales, frutales, viñas y parronales, además de la presencia de la industria del cobre (Fundición Caletones y la División El Teniente de Codelco). A nivel internacional, niveles elevados de cobre desde fuentes naturales e industriales también han sido reportados en varios países productores de cobre como Chile,

China, Indonesia, Rusia, Zambia y Australia (De Gregori et al. 2003, Altimira et al. 2012). En países de la UE para evitar estos problemas, los compuestos cuya sustancia activa es cobre se encuentran en la lista de candidatos a ser substituidos, de acuerdo a la regulación (EC) N° 1107/2009.

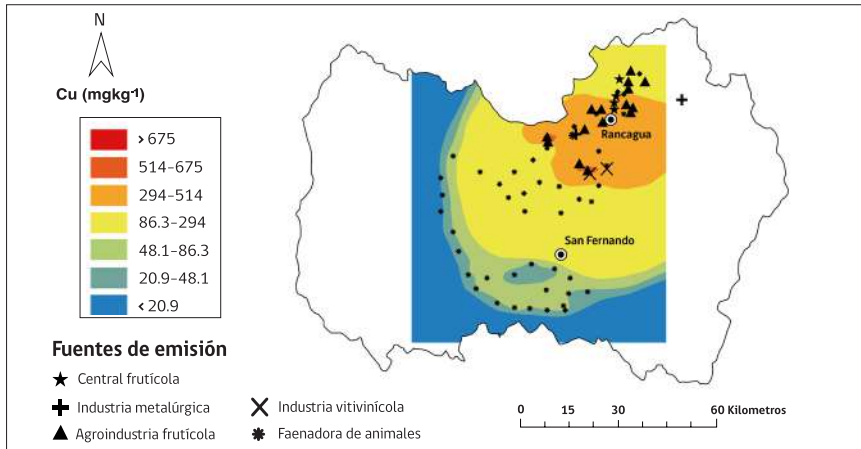


Figura 3. Distribución de contenidos de cobre en suelos recolectados de la Región de O'Higgins, según Burgos, 2017.

Referencias

Altimira, F., C. Yáñez, G. Bravo, M. González, L.A. Rojas, et al. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology* 12(1): 193. doi: 10.1186/1471-2180-12-193

Burgos, O. 2017. Distribución y evaluación de As, Cd, Cu, Ni, Pb, Se y Zn, en suelos agrícolas de la zona central de Chile. Informe de proyecto para optar al título de Ingeniero Civil. Universidad Católica de la Santísima Concepción. 300 p.

Cazorla, F.M., E. Arrebola, A. Sesma, A. Pérez-García, J.C. Codina, et al. 2002.

Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from Mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopathology* 92(8): 909-916. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.8.909.

De Gregori, I., E. Fuentes, M. Rojas, H. Pinochet, and M. Potin-Gautier. 2003. Monitoring of copper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. *Journal of Environmental Monitoring* 5(2): 287-295

Puig, S., E.M. Rees and D.J. Thiele. 2002. The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure* 10(10):1292-5.