

Aparición de mutantes resistentes a cobre en la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa*: implicaciones en el uso de cobre como alguicida

Fernando Marv, Mónica Rouco, Victoria López Rodés y Eduardo Costas.
*COVEMI. Control Veterinario de Microorganismos. Facultad de Veterinaria,
Departamento de Producción animal, Universidad Complutense de Madrid.
Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040. Madrid*

Resumen

La proliferación masiva de cianobacterias tóxicas en embalses de abastecimiento supone un riesgo para la salud pública. Para el control de estos blooms se realizan tratamientos con alguicidas como el sulfato de cobre. Actualmente se desconoce el efecto de los tratamientos masivos con alguicidas sobre la dinámica de las poblaciones de cianobacterias a largo plazo. Este trabajo es una revisión sobre la adaptación de las cianobacterias a dosis letales de sulfato de cobre, usando como microorganismo experimental *Microcystis aeruginosa*. Mediante un análisis de fluctuación, demostramos que las células resistentes a sulfato de cobre aparecen gracias a una mutación espontánea que ocurre al azar antes de la exposición al cobre. La frecuencia de aparición de la mutación que permite el paso de células sensibles a células resistentes es de $1,76 \cdot 10^{-6}$ mutantes por división celular. Las células resistentes tienen una tasa de crecimiento menor que las células sensibles en ausencia de cobre, sin embargo son las únicas capaces de crecer en concentraciones mayores a $5,8 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre.

Introducción

Los fenómenos de crecimiento masivo de cianobacterias tóxicas han sido descritos en diversas partes del mundo [1]. Este crecimiento masivo supone un serio riesgo para la salud pública si sucede en aguas que el ser humano consume [2]. El sulfato de cobre es uno de los alguicidas más usados para reducir la carga de microalgas productoras de biotoxinas en embalses de abastecimiento [3]. El ión cprico (Cu^{2+}) liberado a altas concentraciones tiene diferentes efectos sobre las microalgas: inhibición de la fijación de CO_2 , inhibición de la actividad del fotosistema II [4], inhibición de la asimilación de nitrato y síntesis de nitrato reductasa [5], además de cambios en el volumen celular [6]. También es capaz de provocar lisis celular, y por tanto liberación de toxinas al medio [7]. Por este motivo es aconsejable que los tratamientos con cobre se apliquen antes de alcanzar una elevada concentración de microalgas tóxicas [1,8].

Actualmente se desconocen los efectos a largo plazo de los tratamientos con sulfato de cobre en los embalses de abastecimiento y, en particular, los efectos de tratamientos repetidos sobre poblaciones de cianobacterias tóxicas. Estos cambios pueden incluir la selección de

determinados genotipos y la aparición de células resistentes al cobre dentro de la población de microalgas tóxicas.

Este trabajo es una revisión sobre cuál es el mecanismo que permite la adaptación de *Microcystis aeruginosa* a dosis letales de sulfato de cobre, tema sobre el que nuestro grupo ha estado trabajando recientemente [9].

Material y métodos

Microorganismos experimentales y condiciones de cultivo. Los experimentos se realizaron con la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Kützinger), cepa MaM1 de la colección de microalgas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Esta cepa fue aislada de un embalse de abastecimiento (La Minilla, Sevilla, España) que nunca fue tratado con cobre. Antes de empezar los experimentos, el cultivo de MaM1 fue reclonado a partir de una sola célula para disminuir al máximo la variabilidad genética. La cianobacteria se cultivó en las condiciones más axénicas posibles en frascos de cultivo celular (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, NJ, USA) con 20 ml de medio BG-11 a pH 7,4 (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germani), 20°C e iluminación continua con tubos fluorescentes a un PAR de 60 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *M. aeruginosa* se mantuvo en cultivo equilibrado [10] mediante la transferencia de un inóculo a medio fresco cada 20 días.

Aparición de células resistentes. Las células resistentes se obtuvieron por medio del análisis de fluctuación de Luria y Delbrück, modificado para cultivos líquidos de microalgas por López-Rodas, 2001 [11] y Costas, 2001 [12]. Este método permite diferenciar si las células resistentes aparecen gracias a una mutación espontánea que tiene lugar antes de la exposición al sulfato de cobre (mecanismo de adaptación preselectivo), o si la adaptación es consecuencia de un cambio fisiológico o específico en respuesta al sulfato de cobre (mecanismo de adaptación postselectivo).

El análisis de fluctuación consta de dos partes. En la primera (set 1) cada cultivo es inoculado con muy pocas células sensibles ($N_0 \approx 100$ células), una cantidad suficientemente pequeña para asegurar la ausencia de mutantes resistentes. Se deja que estas células se dividan en condiciones no selectivas hasta alcanzar un determinado número ($N_t \approx 10^5$ células) y en este momento se añade el medio selectivo (sulfato de cobre) a una concentración letal. En el set 2 se fundan alícuotas ($N_t \approx 10^5$ células) procedentes de la misma población parental que las células del set 1, en medio con la misma concentración de sulfato de cobre que en el set 1. Ambos sets se mantienen en condiciones selectivas el tiempo suficiente para que si existen células resistentes estas puedan crecer. Al final del experimento se determina el número de células resistentes que hay en cada uno de los cultivos. En el set 1, si las células resistentes aparecen por una adaptación fisiológica o un mecanismo de mutación post-selectivo, la varianza del número de células por cultivo será baja (por tanto $\text{varianza}/\text{media} \approx 1$) ya que todas las células

tienen la misma probabilidad de desarrollar resistencia. Por el contrario, si las células resistentes aparecen por una mutación preselectiva, la varianza de células resistentes por cultivo será muy alta (varianza/media > 1) porque las mutaciones preselectivas aparecen al azar antes de la selección. Independientemente del mecanismo de aparición de los resistentes, la varianza esperada en el set 2 será baja (si el experimento se realiza correctamente). Por tanto, similar relación varianza/media entre ambos sets significa que las células resistentes aparecen por una mutación postselectiva o una adaptación fisiológica. Si hay diferencia entre esta relación, (relación varianza/media) y además es significativamente mayor en el set 1 que en el set 2, las células resistentes aparecen por una mutación preselectiva.

El experimento se realizó en placas de 96 pocillos. En el set 1 se inoculó en 198 pocillos una cantidad inicial de $N_0 \approx 10^2$ células sensibles de *Microcystis aeruginosa*. Estas células crecieron en condiciones no selectivas y axénicas. Una vez que los cultivos alcanzaron la cantidad de $N_t \approx 10^5$ células se suplementaron con el medio selectivo (sulfato de cobre, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, preparado en agua destilada) de modo que el ión cúprico (Cu^{2+}) quedó a una concentración de 10 μM . En el set 2 del experimento se inoculó $N_t \approx 10^5$ de *M. aeruginosa* sensible, procedentes de la misma población parental, en 198 pocillos de placas de 96 pocillos, con medio fresco a una concentración de Cu^{2+} de 10 μM . Ambos sets se fundaron simultáneamente. Tras 30 días de incubación, se determinó la proliferación celular en cada uno de los pocillos usando un microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany). El número de células resistentes en cada uno de los pocillos fue determinado por dos personas de manera independiente, usando un hemocitómetro (double Neubauer, ruling, Fortuna W.G. Co., Wertheim, Germany).

Con los datos experimentales se estimó la tasa de mutación (μ) a través de la siguiente ecuación:

$$P_0 = e^{-\mu (N_t - N_0)}, \text{ Luria y Delbrück [13]}$$

donde P_0 es la proporción de cultivos del set 1 en los que no aparecen células mutantes resistentes, μ es la tasa de mutación, N_0 es el número de células iniciales y N_t el número de células finales.

Caracterización de los mutantes resistentes al cobre. Una vez aisladas, las células resistentes fueron cultivadas durante 60 días. Para la caracterización fenotípica se fundaron cultivos con $N_0 = 5 \cdot 10^4$ células resistentes y sensibles y fueron mantenidas en ausencia de sulfato de cobre durante 4 días. Tras este periodo, se fundaron distintos cultivos de células resistentes y sensibles a diferentes concentraciones de sulfato de cobre: 1; 1,8; 3,2; 5,8; y 10,4 μM . Se realizaron tres réplicas de cada una de las concentraciones para células sensibles y resistentes. Además se fundaron 6 cultivos control (sin sulfato de cobre). Se estimó la tasa de crecimiento de

células resistentes y sensibles en presencia de las diferentes concentraciones de sulfato de cobre a través del recuento de las células con un hemocitómetro.

El parámetro de tasa de crecimiento maltusiano se calculó a través de la siguiente fórmula [14]:

$$N_t = N_0 e^{m \cdot t}$$

donde N_0 es el número inicial de células, N_t es el número final de células y t corresponde a 5 días.

Resultados y discusión

Al tratar los cultivos del set 1 con 10 μM de Cu^{2+} la densidad celular se redujo drásticamente a los pocos días debido a la lisis de las células sensibles por efecto del cobre. Sin embargo, tras cuatro semanas de incubación, en los cultivos en los que había células resistentes al cobre aumentó la densidad celular (Tabla 1). En el set 2 se observó crecimiento de células resistentes en todos los cultivos tras 4 semanas de incubación (Tabla 1).

Analizando la relación varianza/media, deducimos que las células resistentes se originan a partir de una mutación espontánea que se produce, en el caso del set 1, en el tiempo en que los cultivos pasan de 10^2 a 10^5 células [15]. La relación varianza/media del set 1 fue mucho mayor que en el set 2 (Tabla 1). La tasa de mutación estimada para la adaptación al ión cúprico de *M. aeruginosa* fue de $1,76 \cdot 10^{-6}$ mutantes por división celular, dos órdenes de magnitud mayor que la estimada por Klug [16].

	Set1	Set2
Número de cultivos	198	198
Número de cultivos sin células resistentes	166	0
Número de cultivos con células resistentes	32	198
Varianza/Media	> 50	1
Tasa de mutación (mutaciones por división celular)	$1,76 \cdot 10^{-6}$	

Tabla 1. Resultados del análisis de fluctuación.

La relación dosis-efecto de sulfato de cobre muestra distintos patrones para células resistentes y sensibles. En ausencia de sulfato de

cobre, el parámetro Maltusiano de Fitness para células resistentes es un 20% menor que para las sensibles. En presencia de sulfato de cobre varía según la concentración. A bajas concentraciones (entre 1 y 1,8 μM) la tasa de crecimiento de células resistentes es significativamente menor que la de células sensibles. A las concentraciones de sulfato de cobre de entre 3,2 y 10,5 μM las células resistentes muestran su tasa de crecimiento más alta, mientras que en las células sensibles el crecimiento se inhibe por completo.

El fenómeno de aparición de células mutantes resistentes al cobre es muy interesante a la hora de establecer un tratamiento en embalses de abastecimiento. En una población de *Microcystis aeruginosa* en medio no selectivo existen células resistentes al cobre que aparecen con una frecuencia muy baja por una mutación espontánea. Estos mutantes tienen una tasa de crecimiento mucho menor que las células sensibles en medio no selectivo. Por esta razón, los mutantes resistentes serán eliminados de la población por procesos de selección natural. La proporción de mutantes que se mantiene en la población puede ser determinada como el equilibrio entre la tasa de mutación y la tasa de eliminación por selección:

$$\mu (1-q) = q (1-s),$$

donde μ es la tasa de mutación, q es la frecuencia alélica del mutante resistente al cobre y s es el coeficiente de selección del mutante [14,17]. En el caso del ión cúprico, se mantienen alrededor de 9 mutantes resistentes por millón de células.

En este trabajo se ha utilizado la concentración de sulfato de cobre recomendada para el control de proliferaciones masivas de cianobacterias en embalses de abastecimiento, la cual destruye sin problema las células sensibles al superar sus posibilidades de adaptación fisiológica. Sin embargo, las células con resistencia al sulfato de cobre son capaces de proliferar. Por ello en los embalses de abastecimiento, los tratamientos repetidos con sulfato de cobre pueden seleccionar la presencia de genotipos resistentes de *Microcystis aeruginosa*, volviendo totalmente ineficaces estos tratamientos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CGL2004-02701/HID, CGL2005-01938/BOS Parques Nacionales 093/2003, Comunidad de Madrid P05-RNM-00935 y DOÑANA-2005.

Referencias

- [1] Carmichael, W.W. 1992. A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-green algae) and their Toxins. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development. US Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH.

- [2] Codd, G.A., C.J. Ward, S.G. Bell. 1997. Cyanobacterial toxins: Occurrence, models of action, health effects and exposure routes. En: Seiler J.P., E. Vilanova (Eds). *Applied toxicology: approaches through basic science. Archives of toxicology*, Suppl. 19. Springer. Berlin. 399-410.
- [3] Hudrey, S., S. Burch, M. Burch, M. Drikas, R. Greorgy. 1999. Remedial measures. En: Chorus, I., J. Bartram (Eds). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Routledge. London. 275-312.
- [4] Pandey, P.K., C.B. Singh. 1992. Cu uptake in a cyanobacterium: fate of selected photochemical reactions. *Curr. Microbiol.* 24:35-9.
- [5] Harrison, W.G.A., R.W. Eppley, E.H. Renger. 1977. Phytoplankton nitrogen metabolism, nitrogen budgets and observation on copper toxicity: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27:44-57.
- [6] Sorentino, C. 1979. The effects of heavy metal on phytoplankton- a review. *Phykos (Inst Ocenogr d'Alger, Alger- Bourse)*. 18:149-61.
- [7] Kenefick, S.L., S.E. Hrudey, H.G. Peterson, E.E. Prepas. 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water. Sci. Technol.* 27:433-40.
- [8] Hullebusch, E.V., V. Deluchat, P.M. Chazal, M. Baudu. 2002. Environmental impact of two successive chemical treatments in a small shallow eutrophied lake: Part II. Case of copper sulphate. *Environ. Pollut.* 120:627-34.
- [9] Garcia-Villada, L., M. Rico, M. Altamirano, L. Sánchez-Martin, V. Lopez-Rodas, E. Costas. 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algaecide. *Water Res.* 38:2207-2213.
- [10] Cooper, S. 1991. *Bacterial growth and division. Biochemistry and regulation of prokaryotic and eukaryotic division cycles*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, London.
- [11] López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur J. Phycol.* 2001. 36: 179-90.
- [12] Costas, E., E. Carrillo, L.M. Ferrero, M. Agrelo, L. García-Villada, J. Juste, V. López-Rodas. 2001. Mutations of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) herbicide. *Phycologia.* 40:391-8.
- [13] Luria, S., M. Delbrück. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics.* 28:491-511.
- [14] Crow, J.F., M. Kimura. 1970. *An introduction to population genetics theory*. Harper & Roll. New York.
- [15] Lea, D.E., C.A. Coulson. 1949. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* 49:264-85.
- [16] Klug, W., M.R. Cummings. 2003. *Concepts of genetics*. 7th ed. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, NJ.
- [17] Spiess, E.B. 1989. *Genes in populations*. 2nd ed. Wiley. New York.