

20
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

Contaminación Ambiental con Iones de Metales
Pesados. Evidencia indirecta basada en la tolerancia
de Pseudomonas aeruginosa

T E S I S

Que para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a:

Marcelina Becerril Argüello

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
I.- GENERALIDADES	5
1). Contaminación	5
2). Factores que contribuyen	7
3). Tipos de contaminación	13
4). Efectos de la contaminación sobre la salud	17
5). Problema de contaminación por iones de metales pesados	20
6). Bacterias que son capaces de degra- dar contaminantes	25
7). Mecanismos involucrados en esa de-- gradación	28
8). Implicaciones del uso de bacterias como parámetro para determinar la - contaminación ambiental	42
II.- PARTE EXPERIMENTAL	44
1). MATERIAL	44
1.1 Material biológico	44
1.2 Medios de cultivo	45
1.3 Reactivos	46

	B.-
1.4 Vidriería y equipo	47
2). METODOS.	48
2.1 Toma de productos y aislamiento.	48
2.2 Identificación bioquímica de -- <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	50
2.3 Determinación de tolerancia y -- susceptibilidad a metales pesados	50
III.-	
III.- RESULTADOS	57
1). ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE ME- TALES PESADOS SOBRE CIEN CEPAS DE -- <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	57
2). ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE ME- TALES PESADOS SOBRE CEPAS DE <u>Pseudomo-</u> <u>nas aeruginosa</u> aisladas de distintos orígenes.	67
IV.- DISCUSION DE RESULTADOS.	90
V.- CONCLUSIONES	98
VI.- PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	100
BIBLIOGRAFIA	101

La contaminación ambiental es uno de los aspectos más negativos de la problemática en la sociedad actual, aunado a la explosión demográfica, el uso irracional de los recursos naturales y la espiral inflacionaria, ya que entraña una grave amenaza de dimensión icalculable para el género humano, - debido al creciente incremento en la cantidad de contaminantes que rebasan los niveles umbral permitidos. El problema de este fenómeno depende de su persistencia en el ambiente - que rodea toda forma de vida, así como su interacción con -- otros productos químicos que existen en el medio. (81, 47)

Muchas de las sustancias que contaminan el ambiente, establecen contacto con éste, como resultado de las actividades naturales y aquéllas generadas por el hombre, como consecuencia del avance tecnológico que ha desarrollado, sobre -- todo en las grandes ciudades. (16)

El creciente desarrollo industrial se encuentra íntimamente relacionado con la presencia de estos iones de metales pesados en el ambiente, habiendo generado ya problemas - en algunos países entre los que se encuentra el nuestro, debido a la elevada toxicidad de sus sales solubles que pueden - acumularse en los organismos que las absorben, sin embargo, existe un grupo de microorganismos que pueden llevar a cabo la degr

dación o utilización de los mismos para su desarrollo, (4,56). Es por esto que se seleccionó en el presente trabajo a Pseudomonas aeruginosa, como un microorganismo capacitado para degradar este tipo de contaminante, tomando en cuenta que es un microorganismo fisiológicamente versátil, ampliamente distribuido en el suelo, en el agua, aguas negras, intestino de mamíferos y en plantas, es decir, es un organismo ubicuo que puede sobrevivir por períodos prolongados a temperatura ambiente, -- consecuencia de su capacidad para metabolizar una variedad de sustancias de distinta naturaleza.

Las enfermedades debidas a Pseudomonas aeruginosa, frecuentemente están restringidas a pacientes hospitalizados, -- quienes pueden adquirir este microorganismo de fuentes ambientales.

Se refirió ya en la literatura el uso de metales pesados en alimentos para promover el desarrollo o como terapéuticos y otros más, han sido frecuentemente referidos como contaminantes ambientales. Algunos de estos metales pesados son capaces de afectar al microorganismo a determinadas concentraciones; sin embargo, otros pueden generar tolerancia en la bacteria e incluso, ésta puede actuar como adsorbente y transformarlos en productos menos tóxicos. (31, 32,33)

En base a la contaminación ambiental existente y tomando en consideración la versatilidad fisiológica de Pseudomonas

aeruginosa para procesar una amplia variedad de sustancias, - el presente trabajo está dirigido a determinar la tolerancia a iones de metales pesados por esta bacteria e indirectamente evidenciar la contaminación ambiental por éstos.

O B J E T I V O G E N E R A L

Determinar la tolerancia de Pseudomonas aeruginosa a iones de metales pesados.

O B J E T I V O S P A R T I C U L A R E S

- 1). Aislar y caracterizar bioquímicamente a Pseudomonas aeruginosa.
- 2). Determinar tolerancia a iones de metales pesados.
- 3). Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) cincuenta, setenta y cinco y noventa.
- 4). Analizar los resultados.

H I P O T E S I S D E T R A B A J O

Con base en la contaminación ambiental existente, y tomando en consideración la versatilidad fisiológica de Pseudomonas aeruginosa, para procesar productos tóxicos a los cuales es tolerante, es posible determinar de manera indirecta la contaminación ambiental con iones de metales pesados.

I

G E N E R A L I D A D E S

1). CONTAMINACION.

La contaminación del aire, del agua y del suelo y sus efectos en el medio ambiente; son temas de profunda inquietud y estudio en nuestra época. Los efectos que el hombre mismo padece, así como las muertes masivas por enfermedades imputables directamente a la contaminación, han determinado el nacimiento de cierta conciencia social sobre los peligros que entraña la degradación del medio ambiente y la preocupación -- para encontrar las armas más eficaces para combatir a este -- enemigo común. (3, 21)

Contaminación puede definirse como un cambio indeseable en las características físicas, químicas o biológicas del aire, agua o tierra que pueden afectar la salud, la supervivencia, o las actividades de los humanos o de otros organismos vivos. Nótese que bajo esta definición de contaminación, no necesariamente tiene que causar daño físico, puede solamente interferir con las actividades humanas, por ejemplo: Un lago puede considerarse contaminado si no puede usarse para actividades marítimas. (20, 21, 61)

El problema con la definición de contaminación es, --

específicamente, que constituye un cambio indeseable, el cual requiere un valor de juicio. Muchas alteraciones del medio ambiente, tienen efecto indeseable sobre los humanos y sobre otros organismos vivos. La misma alteración, sin embargo, -- puede considerarse favorable para algunos o el efecto indeseable puede considerarse aceptable cuando se compara con el -- efecto favorable. Por ejemplo, los desechos químicos industriales que se vierten en el aire o en el agua, pueden perjudicar a los humanos y a otros organismos que viven cerca de la planta, sin embargo, si el material que se requiere para controlar la contaminación es muy caro, la planta puede verse obligada a cerrar. Los trabajadores que perderían su trabajo pueden sentir que el riesgo de la contaminación del aire y del agua no es tan serio, comparado con el beneficio de tener trabajo. Lo mismo sucede con otros contaminantes como el DDT, -- en los cuales los beneficios sobrepasan los efectos indeseables de la contaminación. Por lo tanto, la determinación del efecto favorable contra el efecto indeseable de un medio ambiente alterado, es un proceso muy controversial y difícil. --

(47)

Reportes recientes han manifestado un mayor interés -- en el incremento de la cantidad de contaminantes, debido a -- que los niveles umbral y toxicidad de algunos contaminantes -- emitidos en cantidades relativamente pequeñas, son más perjudiciales que otros emitidos en mayor cantidad. Se ha observa

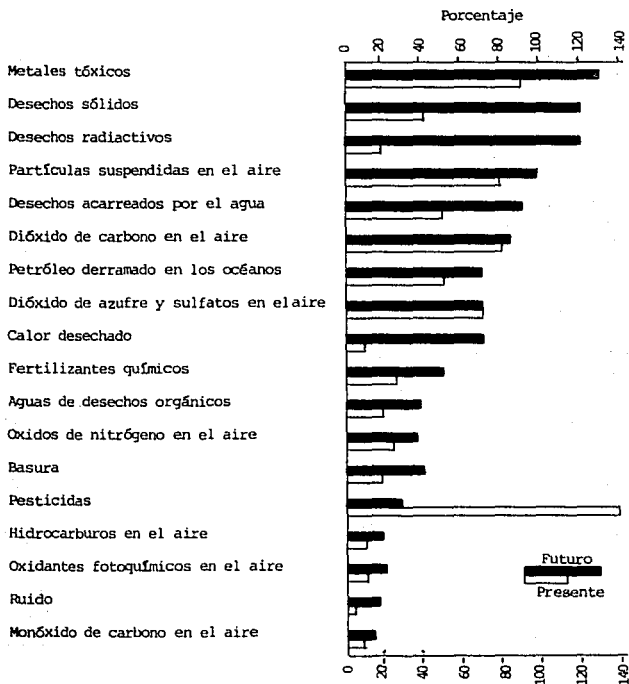
do que algunos contaminantes son más dañinos, porque son poco degradables o no degradables. En consecuencia, los contaminantes persistentes en el aire y océanos, como el DDT y sustancias radiactivas, pueden ser transportados a grandes distancias. Entonces, el estrés total del medio ambiente por un contaminante en particular, depende de su persistencia, su rango geográfico, sus interacciones con otros productos químicos y organismos y su toxicidad. En la figura número uno, se expone la estimación del aumento relativo de algunos contaminantes comunes del medio ambiente en la actualidad y en el futuro (tomando en cuenta las velocidades presentes de las emisiones de los contaminantes), aunque la mayor amenaza para los humanos y las otras formas de vida, no se muestra aquí, esta amenaza es la guerra, especialmente nuclear. (17,22,47)

2). FACTORES QUE CONTRIBUYEN.

Las sustancias contaminantes pueden entrar al medio ambiente como resultado de actividades naturales o actividades humanas. En la tabla número uno, se encuentran varios ejemplos de contaminantes generados por ambos tipos de actividades. En suma, hay usualmente una importante diferencia entre la contaminación natural y la contaminación generada por la actividad humana. Por lo general, la primera se concentra en una área en particular y normalmente se diluye o degrada a niveles inofensivos. En contraste, los más serios pro

F i g u r a # 1

Cálculo aproximado de la alteración total del medio ambiente en la actualidad y en el futuro.



Cada uno de los índices contiene factores importantes por la persistencia y rango geográfico (1 a 5) y las interacciones y efectos tóxicos (1 a 9); entonces el posible aumento en los valores es 225 (5 x 5 x 9). (Datos de Howard Reiquam, de un reporte presentado en 1971 en una reunión de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia). (16)

T a b l a # 1 (16).

CONTAMINANTES GENERADOS POR ACTIVIDADES HUMANAS Y NATURALES

- 1a. Clase: Casi completamente generados por actividades humanas.
DDT, PCBs y otros compuestos hidrocarbonados.
Plomo en el aire (proveniente de la gasolina).
Desechos sólidos y líquidos.
- 2a. Clase: Generados principalmente por actividades humanas.
Desechos radiactivos, petróleo en los océanos, aguas de desecho de plantas y animales, fosfatos en sistemas acuáticos, calor desechado en ríos, lagos y océanos, dióxido de azufre en el aire, ruido.
- 3a. Clase: Principalmente generados por fuentes naturales.
Hidrocarburos en el aire, monóxido de carbono en el aire, partículas sólidas en el aire, mercurio en el océano.

blemas de contaminación humana ocurren en o cerca de las - - áreas urbanas o industriales, donde se reportan grandes cantidades de contaminantes en relativamente pequeños volúmenes de agua, aire y tierra. En suma, muchos contaminantes procedentes de actividades humanas no pueden descomponerse por procesos naturales, debido a que son compuestos sintéticos. (3, 5, 21, 22, 40)

En vista de que la causa principal de la contaminación es el hombre, se puede concluir que un aumento en la contaminación es el resultado del desarrollo de la población, -- sin embargo, no es la única causa. La contaminación también es consecuencia de la utilización de recursos como la energía, entonces, la contaminación depende de la cantidad de recursos utilizados por cada persona. Pero la situación es más complicada porque el uso de algunos recursos contamina más que el uso de otros. Por ejemplo, un impreso de aluminio puede gastar más recursos y crear más contaminación que una botella de vidrio retornable. En otras palabras, la contaminación depende también del tipo de tecnología usada, este factor determina la contaminación para cada unidad de recurso utilizado por persona. Se ha propuesto un modelo para estimar la contaminación o impacto al medio ambiente causado por la gente y sus actividades de consumo, en dicho modelo se establece que el total de la contaminación por un producto depende de tres factores: El número de personas, la cantidad de recursos que - -

cada una de ellas utiliza y la contaminación que resulta por cada unidad de recurso utilizado. (16)

Contaminación o impacto ambiental	=	Cantidad de Población	X	Recurso utilizado por persona	X	Contaminación por unidad de recurso utili- zado.
---	---	-----------------------------	---	--	---	---

Podemos utilizar este modelo trifactorial para distinguir entre dos clases de sobrepoblación. Una clase es el resultado de muchas bocas para alimentar, a esta se le llamó sobrepoblación Malthusiana después de que T.R. Malthus, advirtió en 1803 que la cantidad de población tiende a sobrepasar la producción de comida hasta empobrecer su salud y morir de hambre y enfermedad, restableciéndose el equilibrio. En este tipo de sobrepoblación, la cantidad de población tiende a ser mucho más importante que los otros dos factores. En las naciones pobres -- del mundo, esta sobrepoblación causa la muerte de muchas personas. En ciudades tecnológicamente avanzadas como los Estados Unidos de Norteamérica, encontramos un segundo tipo de sobrepoblación llamado sobrepoblación neo-Malthusiana. En ésta, los recursos usados y los factores de contaminación -- son más importantes. Este tipo de sobrepoblación ocurre -- cuando un número relativamente pequeño de personas, están -- usando recursos con relativamente elevada contaminación a -- una velocidad elevada, dando como resultado un aumento en --

los niveles de contaminación, los que pueden amenazar la salud y la sobrevivencia de los humanos y de otras especies, destruyendo los procesos naturales de limpieza y restauración del -- aire, agua y suelo. En este tipo de sobrepoblación, la gente no enferma o muere por falta de comida, sino por la contaminación del aire, agua y tierra. Desde este punto de vista, los Estados Unidos de Norteamérica, pueden considerarse como la na ción más sobrepoblada del mundo, seguida de otras naciones industrializadas. Se estima que el impacto global de las actividades humanas en el medio ambiente se duplica cada catorce - - años, primeramente por el desarrollo económico de las naciones ricas, si no se detiene la velocidad actual y los tipos de - - desarrollo, el impacto global se incrementaría por un factor - de cuatro entre mil novecientos ochenta y dos mil ocho. (9, - 12, 16, 22)

Los estudiosos del medio ambiente como Barry Commoner, refieren que el factor más importante de los tres que integran el modelo, es la contaminación por unidad de recurso utilizado. Sugiere que la introducción al medio ambiente de tecnologías dañinas desde la segunda guerra mundial, ha sido la principal fuente de contaminación en las naciones industrializadas. Esas naciones han cambiado mucho en la producción y consumo de productos naturales que pueden ser degradados, diluidos o absorbidos por procesos de limpieza a productos sintéticos que algunas veces no pueden ser degradado por procesos na-

T A B L A # 2

TRANSICION DE PRODUCTOS NATURALES A SINTETICOS, EN NACIONES -
INDUSTRIALIZADAS DESDE LA SEGUNDA GUERRA MUNDIAL

(16)

PRODUCTO NATURAL	SUBSTITUTO MODERNO
Fibras naturales (algodón, seda, lana); fibras sintéticas basadas en celulosa natural.	Fibras sintéticas (celulosa no)
Madera	Plásticos, aluminio
Jabón	Detergente
Comida natural	Comida con aditivos
Fertilizante natural	Fertilizante sintético
Predadores naturales	Pesticidas
Borrador natural	Borrador Sintético
Colorantes hechos de plantas	Colorantes sintéticos

F I G U R A # 2

Curva J., proyectando cambios en el consumo per cápita de productos sintéticos y naturales. (Datos obtenidos de

R. Houwink, "The Synthetics Age", Modern

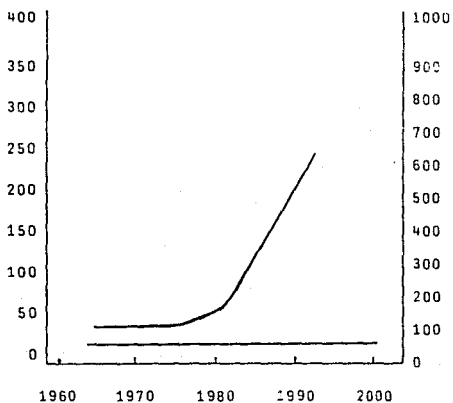
Plastics, Agosto 1966, pág. 66)

(16)

CONSUMO PER CAPITA

(Kg/persona)

(Libras/persona)



manos, pero estos procesos naturales de limpieza pueden ser -- abrumados por aguas no tratadas de una ciudad grande o varias ciudades pequeñas o granjas. Los contaminantes que se degradan lentamente como el DDT y algunos materiales radiactivos, eventualmente se descomponen completamente o se reducen a niveles inofensivos, por ejemplo, generalmente se necesitan cerca de cuatro años para que en el suelo se descompongan al veinticinco por ciento del nivel aplicado originalmente. Los contaminantes que se degradan lentamente, son por lo general, compuestos sintéticos como el DDT y los plásticos, porque la naturaleza generalmente no involucra o no cuenta con procesos para degradarlos. Los contaminantes que persisten a niveles elevados, pueden evitarse desde que llegan al medio ambiente, o controlarlos para que no se acumulen a niveles tóxicos. Los contaminantes no degradables no pueden ser descompuestos por procesos naturales, algunos ejemplos de estos compuestos son: Los metales pesados como el mercurio, plomo y algunos de sus derivados, así como algunos plásticos. Al igual que los contaminantes -- que se degradan lentamente, los no degradables pueden evitarse desde que entran al aire, agua o tierra o pueden mantenerse -- abajo de los niveles tóxicos por remoción del medio ambiente.

(8, 16, 20, 51)

4). EFECTOS DE LA CONTAMINACION SOBRE LA SALUD.

La cantidad de un producto químico o contaminante en particular en el aire, agua, suelo u otro medio, se llama concentración. La concentración de una sustancia se expresa como partes por millón (ppm) o partes por billón (ppb). Una ppm o una ppb, parecen muy pequeñas, pero para algunos organismos y con respecto a algunos contaminantes, éstos pueden ser niveles peligrosos de contaminación. Algunas sustancias llamadas contaminantes no umbrales, son tóxicas para un organismo en particular a ciertas concentraciones, ejemplo, algunos metales pesados y sustancias radiactivas. Otras sustancias llamadas contaminantes umbrales, son tóxicas solamente arriba de una cierta concentración o nivel umbral. Para estos últimos contaminantes la concentración puede incrementarse sin causar daño hasta que el umbral se rebasa. Los umbrales y el daño varían mucho -- dependiendo del contaminante, el organismo y el medio ambiente en el que se encuentran. En suma, la sensibilidad de un organismo a un contaminante en particular, varía en las diferentes etapas de su ciclo de vida. Para muchas especies animales, los niveles umbrales son mucho más bajos durante la etapa juvenil que durante la etapa adulta, (esto puede deberse a que sus mecanismos de defensa no están bien desarrollados en la -- etapa joven), especialmente cierto en el caso del DDT y de algunos metales pesados. Además, muchas sustancias químicas no causan daños inmediatos sino a largo plazo, lo que hace más-

difícil su identificación. (5,16,17,22)

Por otro lado, cerca de cuarenta de los noventa y dos - elementos químicos con persistencia natural en el medio ambiente, son esenciales para muchas formas de vida animal y vegetal. Los nueve elementos que son necesarios en cantidades relativamente grandes (hidrógeno, oxígeno, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio, calcio y potasio), se conocen como macronutrientes. Nuestro cuerpo también contiene trazas de - por lo menos cuarenta elementos (menos que el 0.01% del cuerpo). Catorce de estos elementos traza (y podrían ser más), - conocidos como micronutrientes, son también necesarios para - la vida, ellos son: Yodo, flúor, selenio, sílice, cromo, manganeso, fierro, cobalto, cobre, zinc, molibdeno, estaño, vanadio y níquel. Desafortunadamente algunos de estos nutrientes, junto con otros elementos traza en el cuerpo y varios isótopos radiactivos, pueden amenazar la salud humana cuando están presentes en grandes cantidades, por ejemplo, en Japón se observó que el metil mercurio genera la enfermedad de Minamata y el cadmio ocasiona la enfermedad de Itai-Itai. En la tabla número tres se mencionan algunas alteraciones producidas por varios elementos traza. (16, 22, 52)

T A B L A # 3

ALTERACIONES PRODUCIDAS POR ALGUNOS ELEMENTOS TRAZA,
 CUANDO AUMENTA SU CONCENTRACION EN EL CUER
 PO HUMANO. (16)

ELEMENTO	ALTERACIONES QUE PRODUCE
Cadmio	Enfermedad en las arterias y el corazón, aumento en la presión sanguínea, daño en la espina dorsal, enfermedad del riñón, fibrosis de pulmón y posiblemente cáncer.
Plomo	Daño cerebral, convulsiones, desórdenes de conducta y muerte.
Mercurio	Daño nervioso y muerte.
Berilio	Enfermedades respiratorias crónicas y agudas, - Cáncer de pulmón y beriliosis.
Antimonio	Enfermedad del corazón, daño en la piel.
Arsénico	Envenenamiento acumulativo por aumento en los niveles de este elemento, posiblemente cáncer.
Selenio	Posiblemente cáncer y caries dental.
Manganeso	Daño en los nervios.
Níquel	Cáncer en pulmón.
Cromo	Irritación de las vías respiratorias, ojos y piel.
Cobalto	Dermatitis, alteración de la glándula tiroides y del corazón.

5). PROBLEMA DE CONTAMINACION POR IONES DE METALES PESADOS.

El desarrollo industrial y su creciente complejidad, generan una gran variedad de contaminantes, como el arsénico, algunos elementos derivados de ciertos metales pesados como: Mercurio, plomo, zinc, cobre, etc., los que en algunos países como Japón y México, han generado casos de personas intoxicadas. Estos metales pesados entre los que destacan el plomo, el cadmio y el mercurio, tienen como característica común el vada toxicidad de sus sales solubles, que pueden acumularse en los organismos que las han absorbido. Estos a su vez pueden entrar a la cadena alimenticia que termina en el aparato digestivo del hombre, con sus trágicas secuelas de ceguera, amnesia, raquitismo, miastenia o muerte. (10, 35, 61)

Como resultado de las vías de eliminación de aguas negras y desechos industriales, nuestro medio ambiente se está contaminando cada vez más con metales pesados y su acumulación en las cadenas biológicas podría afectar la selección de bacterias resistentes. Esto podría traer como resultado la perturbación de la vida microbiana en la naturaleza, así como ocasionar un gran daño por la transferencia de la resistencia a metales y antibióticos, especialmente en el caso de microorganismos como P. aeruginosa, que es fisiológicamente versátil, ampliamente distribuido en el suelo, agua, aguas negras e intestino de mamíferos y plantas. Puede ser patógena para huma

nos, ciertos animales, insectos y plantas. En ocasiones las aguas negras y desechos animales que contienen Pseudomonas, -- pueden llegar a contaminar el agua para beber y esto servir -- como una fuente para la transmisión entre los humanos. P. aeruginosa, puede sobrevivir por semanas en el agua a temperatura ambiente. Sus requerimientos nutricionales y capacidad -- para metabolizar una gran variedad de sustancias orgánicas, -- frecuentemente capacita a esta bacteria para sobrevivir y multiplicarse en líquidos y sustancias desinfectantes utilizadas en hospitales. (1, 7, 30, 42,67)

Las enfermedades debidas a P. aeruginosa, frecuentemente están restringidas a pacientes hospitalizados, quienes adquieren este microorganismo de fuentes ambientales (infecciones exógenas). Alternativamente estos pacientes comprometidos pueden adquirirla a partir de su tracto digestivo, respiratorio o piel (infecciones endógenas). Debido a la administración y a la influencia selectiva que ejerce la terapia con antibióticos en los pacientes hospitalizados, la frecuencia de portadores de P. aeruginosa es alta. (31, 36)

Por otro lado, en algunos estudios reportados en la literatura se demuestra que la composición aniónica del medio -- ambiente, influye en la toxicidad de los metales para bacterias y virus, sin embargo, algunos microorganismos pueden absorber los metales pesados, o transformarlos por medio de reacciones enzimáticas en otros productos menos tóxicos, por lo --

que el uso de células microbianas como bioabsorbentes para metales pesados ofrece una alternativa potencial a los métodos existentes para la purificación, recuperación, o ambas de los metales pesados provenientes de una gran variedad de corrientes industriales procesadas. (4, 56)

Muchos metales pesados pueden afectar a los microorganismos a concentraciones que se encuentran en el medio ambiente. Sin embargo, la toxicidad de un metal depende de las características fisicoquímicas del medio ambiente donde se deposita. Factores abióticos como son: pH, temperatura, presión y fuerza iónica, afectan la capacidad de los metales para formar compuestos con varios ligandos y pueden también afectar la toxicidad del metal en el medio ambiente. (17)

Los metales pesados en el medio ambiente marino, actúan como micronutrientes o agentes tóxicos para los microorganismos. La toxicidad puede reducirse o eliminarse cuando los metales se asocian con material orgánico; si se eliminan de la solución como sulfitos de metales o se involucran en reacciones de intercambio catiónico, por lo que la toxicidad de un metal depende de su concentración o de los compuestos que forman (los iones libres de metales, son generalmente los más tóxicos). (13, 22)

Sabemos que el destino de los contaminantes orgánicos en los sistemas acuáticos es esencial. El destino de un com-

puesto químico en el medio ambiente, estaría influenciado por la interacción de los factores físicos, químicos y biológicos. La persistencia del compuesto en muchos casos, se afectaría -- principalmente por su biodegradabilidad. La biodegradación de una sustancia en especial, depende de su estructura y del medio ambiente en el cual está colocada. No obstante, si el compuesto químico es inherentemente metabolizado o no, su última transformación se afectaría más por los factores ambientales -- que por la naturaleza del compuesto químico o los agentes degradativos que podrían estar presentes. (5, 9)

Se han hecho muchos estudios directamente para elucidar los mecanismos bioquímicos por los cuales, un compuesto químico puro es transformado por cultivos puros. Relativamente pocos trabajos han reportado la degradación de contaminantes por el uso natural de las comunidades microbianas. La variabilidad del medio ambiente natural, imposibilita hacer extrapolaciones de los estudios de laboratorio sobre la biodegradación, hasta que se conozcan las variables sobre la actividad degradativa de las comunidades microbianas. (5)

Las bases moleculares del comportamiento de metales no son del todo entendidas. Se ha especulado sobre las vías por las que la toxicidad puede ser el resultado de reacciones de iones metálicos con macromoléculas.

Los iones de metales se requieren para muchos procesos

biológicos con los cuales están ligadas las biomacromoléculas. Estas, frecuentemente contienen iones metálicos sobre el sitio activo, ejemplo, en carboxipeptidasas, fosfatasa alcalina, - - anhidrasa carbónica, citocromo c, ferredoxinas, etc., los iones de metales en dichas sustancias, están directamente involucrados en los procesos biológicos, en los cuales las macromoléculas actúan como intermediarios.

Los iones de metales pesados biológicamente activos, - pueden a veces ser desplazados del sitio activo por otros iones de metales. Por lo tanto, el sitio activo de una macromolécula, es un lugar potencial para la interacción de metales tóxicos. Considerando las bases químicas para la acción de -- los iones de metales tóxicos, se debe tomar en cuenta más de -- un sitio, es decir, se pueden usar todos los grupos de donadores de electrones sobre la macromolécula para ligar iones metálicos, siendo o no parte del sitio activo. Entre tales grupos funcionales están el imidazol, el sulfhidrilo, hidroxil, carbóxil, amino, etc. (20, 37)

Debe reconocerse que la toxicidad es un término relativo. Los iones metálicos que son esenciales para la actividad biológica a una concentración, se vuelven tóxicos a otra diferente. Se conocen enfermedades que resultan de un exceso de -- elementos esenciales, como la enfermedad de Wilson por un incremento de cobre, o la hemocromatosis por un incremento de --

hierro. (20,37)

Se conoce ampliamente el empleo de las sales de cobre en la agricultura como fungicidas, lo que genera su acumulación en el suelo y en vegetales, por otro lado, existen reportes a nivel nacional realizados por Osuna -Páez (46) en aguas de lagunas y playas cercanas a las refinerías petroleras de Coatzacoalcos, Veracruz, en donde la cantidad presente de hidrocarburos no es la única elevada, sino que existen también iones de metales pesados en donde el cobre es uno de los que se encuentran en mayor concentración y constantemente se aíslan de estos lugares microorganismos resistentes a este ion. Se ignora hasta el momento si estos microorganismos pueden transformar al cobre o a sus sales en formas menos tóxicas, sin embargo, existen evidencias de la presencia de plásmidos que confieren resistencia a esta sustancia en algunos microorganismos como E. coli, P. vulgaris, entre otros. (11, 23, 43, 46)

6). BACTERIAS QUE SON CAPACES DE DEGRADAR CONTAMINANTES.

Se ha dicho que los microorganismos resistentes a metales pesados no surgen por casualidad, sino que se desarrollan selectivamente bajo ciertas condiciones o factores. Uno de esos factores, puede ser la contaminación del medio ambiente por metales pesados. Para investigar esta posibilidad, se han hecho estudios de algunas especies microbianas sobre la fre---

cuencia de su resistencia a metales pesados y a agentes antimicrobianos, reportándose que la frecuencia a la primera es la misma o más elevada que la resistencia a antibióticos. (18,57)

Algunas de las especies tolerantes a metales pesados - se encuentran reportadas en la literatura y son las siguientes:

Bacterias tolerantes a mercurio.- Pseudomonas sp, P. fluorescens, Bacillus sp, E. carotovora, B. megaterium, - - - Arthrobacter crystallopietes, Brevibacterium flavum, Micrococcus roseus, S. aureus. (3, 45, 66)

Bacterias tolerantes a zinc.- P. aeruginosa, B. cereus, N. coralina, S. aureus, (4, 66), Klebsiella sp, (3), Alcaligenes entrophus, B. psidocaldarius, B. coagulans, B. megaterium, Curtobacterium pusulum, Aerobacter aerogenes, P. putida (26,44)

Bacterias tolerantes a cadmio.- Pseudomonas sp, B. megaterium, Acinetobacter calcoaceticus, Aeromonas hydrophila, Enterobacter aerogenes, Erwinea carnegiana, P. aeruginosa, - - P. aerofaciens, S. saprophyticus, Arthrobacter crystallopietes, Flavobacterium esteroaromaticum, S. aureus. (3, 66)

Bacterias tolerantes al plomo.- P. maltophila, Alcaligenes sp, B. megaterium, Pseudomonas sp, E. coli, S. aureus, - A. crystallopietes, B. flavum, M. roseus, F. esteroaromaticum, Escherichia sp, Acinetobacter, (3, 66), Aeromonas hydrophila, -

B. roseum, C. poinsettiae, Enterobacter aerogenes, E. carne--
gieana, E. carotovora, E. herbicola, M. luteus, N. asteroides,
Planococcus citreus, P. aeruginosa, P. aureofasciens, Sphaero-
tilus natans, S. lactis, S. saprophyticus, Streptomyces griseus
Xanthomonas begoniae. (4, 66)

Bacterias tolerantes a cobalto.- Pseudomonas sp., B.
megaterium, N. asteroides, S. natans, S. lactis, Streptomyces
griseus, A. crystallopoietes, E. coli. (3, 66), E. aerogenes,
B. subtilis. (62)

Bacterias tolerantes a cromo y molibdeno.- Acinetobac-
ter calcoaceticus, A. hydrophila, A. crystallopoietes, B. fla-
vum, B. roseum, Corynebacterium poinsettiae, Enterobacter aero-
genes, Erwinia carnegieana, E. carotovora, E. herbicola, F. -
esteroaromaticum, M. luteus, M. roseus, N. asteroides, Plano--
coccus citreus, Pseudomonas aeruginosa, P. aureofaciens, S. -
natans, S. aureus, S. lactis, S. saprophyticus, Streptomyces -
griseus, Xanthomonas begoniae, B. megatherium. (3, 7)

Bacterias tolerantes a níquel.- E. coli, (66), E. --
aerogenes, B. subtilis. (62)

Bacterias tolerantes a arsénico.- Veillonella alca--
liescens, M. aerogenes, (15, 54), E. coli. (6, 18)

Bacterias tolerantes a bismuto y antimonio.- S. aureus
 (66).

Bacterias tolerantes a telurito.- E. coli, S. aureus, P. aeruginosa. (58), C. diphtheriae. (41)

7). MECANISMOS INVOLUCRADOS EN ESA DEGRADACION.

Puesto que algunos ambientes naturales contienen elevadas concentraciones de metales pesados, los microorganismos -- han estado expuestos a una gran cantidad de materiales, antes de que la humanidad incrementara las concentraciones locales a causa de la actividad industrial. Por lo tanto, no es sorprendente que los microorganismos hayan elaborado sistemas de resistencia a metales, antibióticos y, en general, a una gran variedad de sustancias. Se han aislado variantes bacterianas que son más resistentes que el tipo silvestre a toda clase de agentes inhibitorios. Generalmente estas variantes surgen por mutaciones. El gen alterado y la sustancia a la cual el microorganismo se vuelve resistente, no necesariamente están directamente relacionados. En algunos casos, esas variantes no son difíciles de aislar en el laboratorio por la técnica de grando en placa. El mecanismo de resistencia no es el mismo para todas las variantes, pero puede caer dentro de varias categorías:

- a). Permeabilidad.- Algunas bacterias se vuelven resistentes porque la mutación altera la membrana celular, lo cual -- permite que el tóxico entre a la célula lentamente.

- b). Enzimas degradadoras.- El agente inhibitorio puede ser atacado por una enzima específica. La resistencia a la penicilina en S. aureus, por ejemplo, se asocia frecuentemente con la producción de penicilinasas.
- c). Alteración del sitio de acción.- Una droga puede ejercer su efecto inhibitorio en un lugar específico de la célula, por ejemplo, la estreptomycinina se liga a una proteína ribosomal específica. En la mutante resistente la estreptomycinina no se liga o en caso de que se llegue a unir, la unión se rompe porque es muy débil, supuestamente porque la proteína se ha alterado. (33)

Similarmente, los procesos enzimáticos que son inhibidos competitivamente por análogos químicos pueden volverse más resistentes a esos compuestos, cuando a través de una mutación, la enzima se vuelve más selectiva, con una mayor afinidad para sus sustratos. Cuando los agentes inhibitorios se relacionan, la mutación que da resistencia hacia alguna sustancia, puede hacer que al mismo tiempo el microorganismo sea resistente a sustancias relacionadas. Este fenómeno se conoce como resistencia cruzada.

El incremento en la resistencia a una droga, puede también estar acompañado por la disminución de la resistencia a otra. Esta relación se llama sensibilidad colateral. Los patrones de resistencia que un microorganismo puede desarrollar hacia un antibiótico específico, están en función de su poten-

cial genético. (33)

En muchas bacterias la resistencia a metales pesados - está asociada a plásmidos, por ejemplo, en E. coli los plásmidos R pueden determinar la resistencia a varios iones metálicos (Hg, Co y Ni). En S. aureus, un plásmido que determina la producción de penicilinasasa puede mediar la resistencia a varios iones metálicos (Hg, Cd, As, Pb, Zn, Bi, Sb). Los mecanismos que controlan la resistencia bacteriana a mercurio y cadmio son completamente diferentes, aún cuando son mediados - por el mismo plásmido. El papel de los plásmidos R en la resistencia a las drogas se ha estudiado ampliamente y las determinantes extracromosomales son una causa principal de este incremento, en un gran número de bacterias resistentes a drogas. - Algunos estudios sobre la resistencia a metales pesados, han intentado establecer una relación entre ésta y la resistencia a drogas en el ambiente hospitalario. Los factores de selección para estas bacterias resistentes a metales pesados no se han identificado todavía. (42, 66)

En algunos casos (As^{5+} , Ag^+ , Cd^{2+}), se ha demostrado - que la resistencia de las bacterias a los metales se debe a diferencias en la captación y/o transporte del metal tóxico. En otros casos (Hg^{2+} , As^{3+} , Cr^{6+}), el metal se transforma enzimáticamente (por oxidación - reducción, metilación o dimetilación) en sustancias químicas que son menos tóxicas o más volátiles.

tiles que las que les precedieron. Parece que estos sistemas de resistencia no solo protegen al microorganismo en un ambiente difícil, sino que también juegan un papel importante en la ciclización de metales tóxicos en la biosfera. (24, 25, 64)

Algunos ejemplos de los posibles mecanismos de degradación enzimática que se llevan a cabo en algunas bacterias tolerantes a metales pesados, son los siguientes: La carboxipeptidasa A pancreática, es una enzima bovina que contiene zinc, el cual es indispensable para que se desarrolle la actividad enzimática. Evidentemente el zinc es solamente una parte del sitio activo, el cual involucra también ciertos aminoácidos que actúan sobre el péptido, uniéndose simultáneamente con el zinc. Coleman y Vallee (37), demostraron hace tiempo, que el zinc -- puede ser reemplazado por otros iones metálicos (Co, Ni, Mn, - Cu, Hg, Cd, Pb), cuando lo es por el cobalto, la actividad se incrementa. Hay también actividad con níquel, muy poca con -- manganeso y actividad nula con cobre, mercurio, cadmio y plomo. De acuerdo a estos datos se podría especular que la razón para esta toxicidad del mercurio y cadmio, por ejemplo, es que éstos reemplazan al zinc requerido para la actividad de carboxipeptidasa. De manera similar actúan los iones de metales pesados - sobre otras enzimas; sin embargo, la toxicidad del metal probablemente involucra otros tipos de interacciones, además de - - aquéllas sobre el sitio activo, éste en una macromolécula bio-

logica que contiene iones metálicos, no es necesariamente el sitio al cual se unen los iones de metales extraños. Desde este punto de vista, el mecanismo involucra además la interacción de los iones metálicos con los sitios de unión de las macromoléculas que no son sitios activos convencionales, aunque están ciertamente activos hacia la interacción con iones metálicos. Algunos de los grupos funcionales de las proteínas, a los cuales se unen los iones metálicos son: El imidazol, sulfhidrilo, hidroxil, carboxil, amino, guanidino y grupos fosfato de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los iones de mercurio son tóxicos para las bacterias porque se ligan ávidamente a grupos sulfhidrilo e inhiben la síntesis macromolecular y la acción de la enzima; el arsénico y el antimonio son tóxicos para las bacterias porque se ligan a residuos de cisteína en las proteínas.

No es por tanto sorprendente, que el mismo ión metálico se ligue a diferentes sitios a distintas concentraciones, ocasionando efectos benéficos y adversos sobre la misma molécula. Esto constituye una ilustración a nivel molecular del Doctor Stickler (37), para demostrar que las sustancias que son tóxicas a niveles elevados, son benéficas a bajos niveles. Una posible explicación de este fenómeno es que a una concentración baja del metal, los iones metálicos se colocan en el sitio activo, o por lo menos, en una posición en la cual tienen un efecto benéfico sobre la enzima, y a concentraciones elevadas, estos iones en exceso se ligarían además a otros sitios -

causando la inhibición. Se producen efectos similares por la adición de iones metálicos a una enzima que no requiere ordinariamente iones metálicos.

Los ácidos nucleicos, al igual que las proteínas, contienen gran número de sitios en los cuales los iones de metales pesados pueden unirse, por ejemplo, grupos fosfato, hidroxil-ribosa y bases heterocíclicas. En los nucleósidos y nucleótidos, los grupos donadores de electrones también pueden ligar iones metálicos y entre ellos se encuentran los grupos amino, nitrógenos heterocíclicos y oxígenos. Cuando los iones de metales pesados se ligan a los grupos fosfato causan efectos muy diversos. Cuando se ligan a las bases, compiten con la unión de iones hidrógeno y causan la destrucción de la doble hélice y también pueden causar la despolimerización de los ácidos nucleicos. (37)

Algunos ejemplos de transformación microbiana de metales pesados a compuestos menos tóxicos son los siguientes: La resistencia bacteriana a mercurio está determinada por la reducción enzimática del ión a mercurio volátil, el cual es mucho menos tóxico, o la transformación de éste en mercapéptidos de mercurio. También el mercurio es virtualmente insoluble en agua y se evapora porque su presión de vapor es elevada. La enzima que cataliza la reducción de mercurio $2+$ (Hg^{2+}), es intracelular (intracitoplásmica). El mecanismo de resistencia -

también involucra un plásmido específico para el sistema de -- transporte de Hg^{2+} . (14)

En el medio ambiente el mercurio se encuentra en tres estados: Mercurio metálico (Hg^0), iones mercúricos (Hg^{2+}), -- iones mercurosos (Hg^+), los cuales se encuentran en equilibrio químico ($Hg_2^{2+} \rightleftharpoons Hg^0 + Hg^{2+}$). El ciclo de mercurio consta de varios procesos químico-biológicos como: Reducción, metilación, degradación de compuestos orgánicos y acumulación del -- metal en plantas y animales. (64)

Algunos microorganismos poseen la capacidad de trans-- formar los iones Hg^{2+} a metil mercurio y dimetil mercurio como un mecanismo de desintoxicación, como es el caso de E. coli, - C. cochlearium y N. crassa. Esta transformación depende de la concentración de iones Hg^{2+} , de la población microbiana, del - pH, de la temperatura, del potencial de oxidación-reducción, de los efectos de sinergismo o antagonismo de los procesos metabólicos y de la concentración de sulfitos en el medio. Otros microorganismos son capaces de degradar algunos compuestos - - organomercuriales utilizados como desinfectantes, estos microorganismos sintetizan las enzimas organomercurito hidrolasa -- para romper los enlaces C-Hg y la mercurio reductasa para redu-- cir los iones Hg^{2+} producidos durante la reacción. (8, 29, 54)

El plomo se encuentra ampliamente distribuido en la na-- turaleza y se conoce desde la antigüedad, sin embargo, no tie-

ne una aplicación terapéutica hasta la fecha. Se reconoce ampliamente por sus efectos tóxicos tanto en animales como en -- otras formas de vida entre las que se encuentran las bacterias, un ejemplo lo tenemos en E. coli en la cual inhibe la incorporación de aminoácidos como la leucina al RNA_+ , deteniendo la -- síntesis proteica. Por otro lado, se conoce la capacidad de -- ciertos microorganismos de transformarlo en compuestos volátiles como el tetrametilo de plomo $(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$, entre los que se -- encuentran miembros del género Pseudomonas, Alcalígenes, Acinetobacter, Flavobacterium y Aeromonas. Hasta el momento se des -- conoce los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la transformación del plomo inorgánico en compuestos orgánicos de natu -- raleza volátil, sin embargo, se sugiere que el acetato de trimetilen plomo juega un importante papel en esta biotransformación para llevar a cabo la metilación del plomo. (51,66)

Se ha observado que distintos microorganismos son capaces de llevar a cabo la inmovilización del plomo cuando éste -- penetra a la célula, como sucede con Micrococcus luteus y Azotobacter, con lo que se reconoce que el plomo atraviesa las cu -- biertas externas de la célula, existiendo evidencias de que es -- ta asociación de cubiertas externas con plomo se realiza a nivel de membrana celular y no a nivel citoplásmico. Además, se sabe que la tolerancia a ciertos iones de metales pesados se en -- cuentra codificada por plásmidos, en el caso del plomo, esto -- se ha confirmado en S. aureus. (44, 66)

En el caso del zinc, se conoce ampliamente su participación en ciertas enzimas bacterianas, como ejemplo, está la fosfatasa alcalina, y se emplea a nivel de medicina como astringente y débilmente antiséptico, sin embargo, a concentraciones altas puede llevar a cabo la inhibición de los microorganismos. El zinc puede llegar a afectar poblaciones microbianas de manera directa debido a su toxicidad, o bien, de manera indirecta como consecuencia de los efectos del medio ambiente. La concentración del zinc en el medio ambiente se eleva constantemente debido a la contaminación ambiental provocada principalmente por los desechos industriales, por lo que se han detectado altas concentraciones de zinc en lugares cercanos a fundidoras como suelos, lagos, ríos, sedimentos y aguas de riego, lo que ocasiona su acumulación en plantas y peces de consumo humano.

(26, 63)

Los mecanismos probablemente involucrados en la tolerancia a zinc de algunos microorganismos como P. putilla, B. coagulans, A. aerogenes, etc., se orientan a la existencia de un ácido graso (ácido ω -cicloheptil undecanoico), el cual parece influir en la penetración de éste al interior de la célula. Algunos estudios efectuados en E. coli indican que los iones zinc se transportan a través de la membrana celular por una vía análoga al transporte de magnesio y que una vez dentro de la célula el zinc actúa a nivel de cadena respiratoria inhibiendo la succinato oxidasa e impidiendo el transporte de elec

trones; o también actúa inhibiendo el transporte de fosfato, - lo cual ocasiona la inhibición del transporte de citrato, glu- cosa y alanina a través de la membrana. La resistencia al zinc también está relacionada con plásmidos, lo que se ha observado en algunas especies bacterianas como S. aureus en el que se han identificado plásmidos que comparten genes de resistencia al - zinc y cadmio. (44, 48, 64, 85)

Se han reportado pequeñas concentraciones de metales - como el cromo, cobalto y níquel, en ambientes naturales, lo -- cual ha propiciado la selección de variantes resistentes a los mismos tanto en ambientes acuosos cercanos a fábricas, como en suelos y aguas residuales de ambientes hospitalarios. El meca- nismo de acción de estos contaminantes se relaciona con el sig- tema de transporte, que en el caso de cobalto y níquel inhiben el de los iones de magnesio, permitiendo además la salida del magnesio intracelular con la subsecuente acumulación de cobalto y níquel a nivel intracelular, como es el caso de E. coli, E.- aerogenes y B. subtilis. En el caso del níquel, éste inhibe el transporte de carbohidratos. (7, 35,62). Se ha observado que en aquéllos sitios donde es alta la acumulación de estos iones de metales pesados, la resistencia de los microorganismos se - encuentra codificada por plásmidos, con la subsecuente trans- formación de estos iones como en el caso del cromo, en el cual existen evidencias de la metilación del cromo II para obtener metil cromo que es inestable y que reacciona formando cromo III

y metano. Otros autores mencionan que estos microorganismos - portadores de plásmidos son capaces de reducir el cromo (IV) - que es altamente tóxico, en cromo (III). Existen evidencias - en la literatura, de que estas bacterias se han aislado en sitios donde el cromo, cromato y dicromato se encuentran en altas concentraciones y también se han aislado del suelo y de -- aguas residuales de hospitales. La información genética que - codifica para esta resistencia, se ha observado que también co - difica la resistencia a agentes antimicrobianos. (50, 54)

Con respecto al cobre, se conoce ampliamente el empleo de sus sales en la agricultura como fungicidas, lo cual genera su acumulación en el suelo y en vegetales, por otro lado, exis - ten reportes a nivel nacional realizados por Ozuna-Pérez (46) - en aguas de lagunas y playas cercanas a las refinerías petrole - ras de Coatzacoalcos, Veracruz, en donde la cantidad presente de hidrocarburos no es la única elevada, sino que existen tam - bién iones de metales pesados en donde el cobre es uno de los que se encuentran en mayor concentración y constantemente se -- aíslan de estos lugares microorganismos resistentes a este ión. Se ignora hasta el momento si estos microorganismos pueden - - transformar al cobre o a sus sales en formas menos tóxicas; -- sin embargo, existen evidencias de la presencia de plásmidos - que confieren resistencia a este metal, en algunos microorga-- nismos como E. coli, P. vulgaris, entre otros. (11, 23, 43, 46, 59)

En lo que se refiere al telurito, se han encontrado va riantes tolerantes a este metal, debido a su existencia en el medio ambiente. El estudio de la resistencia de microorganismos a dicho metal es de gran importancia, ya que entre ellos se encuentran bacterias patógenas para el hombre como S. aureus. Se ha determinado experimentalmente que la resistencia al telurito es codificada por plásmidos y el mecanismo involucrado -- en esta resistencia es la reducción del telurito a teluro metálico, la cual se lleva a cabo a través de grupos sulfhidrilos, con la incorporación posterior del teluro a la metionina y posi blemente a la cisteína. También se ha observado en algunos mi croorganismos que la reducción del telurito a teluro metálico se lleva a cabo intracelularmente. Parte del teluro formado se deposita en el espacio periplásmico, parte extracelularmente y en el nucleoplasma; se ha encontrado que las enzimas telurito reductasa y malato deshidrogenasa son indispensables para la reducción del telurito por este método. Otro mecanismo de desintoxicación del teluro, incluye la producción de compuestos metilados como el dimeril teluro. La metilación del teluro se lleva a cabo siempre y cuando en el medio se encuentren presentes los metales selenio y teluro, en ausencia del selenio la metilación del teluro no se efectúa. (24,25, 41, 54, - 58)

Entre los metalocitos, el arsénico es de gran importancia en la ecología, debido a que frecuentemente se encuentra -

en el ambiente ocasionando graves problemas en la flora y fauna, así como en salud pública. Este puede ser transformado -- por microorganismos en compuestos menos tóxicos, lo que constituye un mecanismo de tolerancia y de desintoxicación para aquellos que al aprovechar esta capacidad se pueden emplear como un control de la contaminación ambiental. Entre las bacterias inicialmente identificadas con esta propiedad se encontraban Veillonella alcalescens y Micrococcus aerogenes, sin embargo, se ha observado que cepas de E. coli enterotoxigénica pueden ser tolerantes a este metaloide, presentando además resistencia a agentes antimicrobianos, producción de colicinas y tolerancia a metales pesados entre los que se encuentran el arsénico, mercurio y telurito. (15, 13, 19). En medios acuáticos, el arsénico generalmente se encuentra en forma de arsenito y arsenato. Algunos microorganismos como Bacillus arsenoxydans, son capaces de oxidar al arsenito, probablemente debido a una mutación espontánea o por la transferencia de plásmidos R. Algunos microorganismos son capaces de reducir los iones arsenato a arsenito. Algunos investigadores han confirmado que la expulsión de arsenato y arsenito al exterior de la célula es codificada por plásmidos y también es dependiente de energía. (1, 39, 53, 54)

El cadmio es un elemento que se encuentra en pequeñas concentraciones en el agua, plantas y animales; sin embargo, -

debido a la falta de control de los desechos industriales, es uno de los principales contaminantes de ciudades, lagos y ríos. Los iones de cadmio se introducen a la célula por medio de sistemas energéticos de transporte dependientes de manganeso, causando una interrupción rápida de la respiración porque se ligan a los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Los resultados de algunos experimentos indican que en E. coli el cadmio actúa a nivel de ácidos nucleicos, afecta la conformación y cambia las propiedades físicas del DNA, RNA_r, RNA_t e inhibe la síntesis de proteínas. La toxicidad del cadmio se reduce en presencia del manganeso, zinc y del ión Fe²⁺. El aumento de la contaminación ambiental por cadmio ha propiciado el desarrollo de microorganismos resistentes a este metal entre los que se encuentran P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, etc. La resistencia de los microorganismos al cadmio está codificada por plásmidos que codifican además la resistencia a otros metales y antibióticos. Algunos investigadores sugieren que la resistencia de los microorganismos a los iones cadmio, se debe a la disminución en el transporte de este metal a través de la membrana celular. La resistencia al cadmio en otros microorganismos como S. aureus, se debe a un sistema de transporte-excreción de estos iones a nivel de membrana, el cual regula la acumulación interna del cadmio. Cuando la concentración de iones Cd²⁺ es elevada, el metal se acumula intracelularmente. El cadmio que se acumula en el citoplasma se encuentra ligado a proteínas

formando cadmio-metalotioneínas. Se piensa que las metaloproteínas pueden estar implicadas en la homeostasis y desintoxicación de los metales tóxicos. (28,32, 38, 48, 49, 54, 65)

El uso de compuestos de plata como agentes antimicrobianos se ha venido incrementando en el tratamiento tópico de quemaduras y en heridas, esto ha ocasionado la selección de variantes resistentes a dicho metal en aislamientos clínicos; -- sin embargo, también ha habido reportes de cepas microbianas resistentes a plata, las cuales han sido aisladas de zonas cercanas a industrias que utilizan a la plata como materia prima. Algunos investigadores han reportado que la resistencia a plata está mediada por plásmidos. Se han hecho estudios sobre los mecanismos de resistencia a plata en K. pneumoniae. (2, 27, 49)

8). IMPLICACIONES DEL USO DE BACTERIAS COMO PARAMETRO PARA DETERMINAR LA CONTAMINACION AMBIENTAL.

La Bahía de Chesapeake, un gran estuario en el Este de los Estados Unidos, contiene desarrollo de mariscos de importancia comercial y es un criadero de una gran variedad de especies. Desafortunadamente las aguas de esta Bahía están sujetas a contaminación procedente de varias fuentes y las actividades humanas se acreditan la mayor parte de los suministros de metales. Se han hecho estudios sobre el efecto que ejercen sobre la microflora nativa algunos metales pesados que se en-

cuentran en el estuario. Se observó que los metales Co, Cd, Cr, Pb, Hg, ejercen efectos tóxicos sobre los microorganismos, además de que el agua y las muestras de sedimento colectadas de un sitio contaminado con metales pesados en dicha Bahía, - contiene grandes poblaciones de microorganismos resistentes a metales que no se encontraron en muestras de sitios no contaminados. No hay duda de que las capacidades metabólicas de estas bacterias les confieren ventajas selectivas, principalmente en ambientes contaminados. El hallazgo de microorganismos con -- esta característica, representa una evidencia indirecta de la contaminación ambiental observada por la presencia de marcado res de tolerancia a los iones de metales pesados, que se encuentran como contaminantes de la región . (3)

I I

P A R T E E X P E R I M E N T A L

1). MATERIAL.

1.1. Material biológico.

Se estudiaron cien cepas de Pseudomonas aeruginosa.

- a) Ochenta y dos cepas obtenidas de pacientes del pabellón de quemados del Hospital "Dr. Rubén Leñero", del Departamento del Distrito Federal.
- b) Siete cepas obtenidas de pacientes con diagnóstico de fibrosis quística, proporcionadas por la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística.
- c) Once cepas obtenidas del agua de fuentes ornamentales de diferentes áreas de la Ciudad de México.
- d) Cepas control de Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 y Escherichia coli ATCC 29922, proporcionadas por Abbott Laboratories de México -- S.A.

1.2. Medios de cultivo.

a) Medio de transporte:

Caldo nutritivo (Difco 655372)

b) Medios de aislamiento:

Agar MacConkey (Merck 5465)

Pseudomonas agar (Difco 676227)

Agar-Agar (Merck 1614), complementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada.

c) Medios utilizados para la identificación bioquímica:

Agar Kligler (Merck 3913)

Base de caldo rojo de fenol (Bioxon 218-1)

Base descarboxilasa de Moeller deshidratada - (Difco 686811)

Gelatina nutritiva (Merck 4069)

Caldo infusión cerebro corazón (Difco 590277)

Medio de agar citrato de Simmons (Merck 2501)

Medio de cultivo SIM (Merck 5470)

Agar nitrato (Difco 670142)

Caldo nutritivo (Difco 655372)

d) Medio para la observación de pigmento y fluorescencia:

Pseudomonas agar

Infusión cerebro corazón dializado-agar-leche descremada.

e) Medios para la visualización de flagelos:

Agar y caldo tripticasa soya.

f) Agar y caldo Mueller Hinton para las pruebas de susceptibilidad a metales pesados.

g) Adiciones:

Carbohidratos.- Se agregaron en forma individual D(+) xilosa, D(+) glucosa de Merck a una concentración del 10% para el medio OF base.

L(+) aminoácidos.- Se agregaron de manera individual: Arginina (Difco), lisina (Merck) y ornitina (Difco) a una concentración de 1% -- para la base Moeller.

1.3. Reactivos.

a) Prueba de reducción de nitratos, nitritos y - nitrógeno molecular.

. Acido sulfanílico.

. α -naftil amina

. Zinc para la reducción de las sales de diazonio.

b) Para la preparación de diluciones:

. Solución salina isotónica.

. Estándar de Mac Farland.- Cloruro de bario al 0.48 M (0.5 ml.), ácido sulfúrico al --

0.36 N (9.5. ml.).

c) Sales de metales pesados:

- . HgCl_2 (Merck)
- . AgNO_3 (Merck)
- . K_2TeO_3 (Merck)
- . K_2CrO_4 (Merck)
- . CdCl_2 (Merck)
- . $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- . $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Baker)
- . $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Baker)
- . $\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Baker)
- . $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Baker)
- . ZnSO_4 (Merck)
- . $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Baker)
- . $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Baker)
- . $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Products)
- . Li_2SO_4 (Merck)
- . $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Alfa Products)

1.4. Vidriería y equipo:

El experimento se llevó a cabo con el material de vidrio y el equipo utilizados comúnmente en el Laboratorio de Bacteriología, según los requerimientos de cada faceta de la investigación.

2). METODOS.

2.1. Toma de productos y aislamiento.

La toma de la muestra en pacientes con quemaduras de segundo y tercer grado, se efectuó a través del raspado de la lesión, - - empleando para ello hisopos de algodón estériles, así como por la realización de biopsias del límite de tejido sano y quemado, obteniéndose en este último caso, material de aproximadamente doscientos miligramos de peso, el cual se transportó en frascos estériles.

En el caso de los pacientes con fibrosis -- quística, la muestra se obtuvo a través de la expectoración del paciente, recolectada igualmente en frascos estériles.

Para las muestras de agua, se tomaron aproximadamente cien mililitros de agua de las -- fuentes ornamentales de algunas partes de -- la Ciudad.

Todo este material se transportó al laboratorio en un período no mayor de una hora, - procesándose inmediatamente.

En el caso de las muestras tomadas con hiso

po, éste se descargó en el medio de transporte y posteriormente en los medios de aislamiento. Para las biopsias, inicialmente se utilizó solución salina isotónica estéril, se trituro el tejido empleando un mortero estéril y se tomó una alícuota de un mililitro, la cual se depositó en los medios selectivos, realizándose la siembra por estrías abiertas.

Las muestras de agua se sometieron a la técnica del tubo múltiple, empleando caldo Mac Conkey a doble concentración en tres tubos y caldo Mac Conkey en concentración sencilla en seis tubos.

El inóculo para los tres primeros tubos fue de diez mililitros para cada uno, en tanto que para los seis restantes fue de un mililitro para tres de ellos y 0.1 mililitros para los últimos tres.

La incubación se realizó a treinta y siete grados centígrados durante dieciocho a veinticuatro horas para las cajas, en tanto que para los tubos, la incubación se hizo durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas, según la presencia o no, de desarrollo

bacteriano. Posteriormente a este proceso, tanto los tubos que presentaban desarrollo de bacterias lactosa (+), como lactosa (-), se inocularon en los medios selectivos.

Con base en la morfología colonial y en la tinción de Gram, se seleccionaron las colonias sospechosas de ser Pseudomonas y se sometieron a las pruebas de identificación -- bioquímica.

2.2. Identificación bioquímica de Pseudomonas -- aeruginosa.

La identificación bioquímica se realizó empleando las pruebas mínimas necesarias indicadas por la Asociación Americana de Microbiología, que se enlistan en la tabla número cuatro. (34)

2.3. Determinación de tolerancia y susceptibilidad a metales pesados.

Se emplearon dieciseis diferentes sales de metales pesados .

Se utilizó el método de doble dilución seriada en placa de Agar Mueller Hinton, rea-

T A B L A # 4

PRUEBAS MINIMAS PARA LA IDENTIFICACION DE Pseudomonas aeruginosa. (34)

PRUEBAS		%
Flagelo polar monótricos o menos de 3	(+)	93
Movilidad	(+)	93
Glucosa OF abierto	(+)	100
Glucosa OF cerrado	(-)	0
Maltosa OF abierto	(-)	0
Maltosa OF cerrado	(-)	0
Xilosa OF cerrado	(-)	0
Xilosa OF abierto	(+)	98
Medio OF base control azul	(+)	100
Citrato de Simmons	(+)	100
Indofenol oxidasa	(+)	100
Nitrato a gas	(+)	94
L-lisina descarboxilasa	(-)	0
L.arginina dihidrolasa	(+)	93
L-ornitina descarboxilasa	(-)	0
H ₂ S	(-)	0
BHI a 42°C	(+)	100

lizándose la inoculación con el replicador de Steers.

Las cepas problema se sembraron en cinco mililitros de caldo Mueller Hinton y se incubaron durante dieciocho a veinte horas a treinta y siete grados centígrados.

El inóculo empleado fue de 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro - - aproximadamente, ajustándose con el estándar de Mac Farland de 0.5%.

Se colocó un mililitro de cada cultivo en los pozos de la placa del replicador y se procedió a inocular las cajas que se prepararon con diecinueve mililitros de Agar - - Mueller Hinton y un mililitro de la solución de cada metal.

Se partió de una concentración de cien microgramos por diez mililitros de cada sal de metal. Las soluciones de los metales pesados se prepararon el día de su empleo con agua desionizada estéril (diagramas de flujo número uno y número dos). El rango de concentración probado fue de 0.244 a 500 microgramos por mililitro, para las sales de

DIAGRAMA DE FLUJO # 1

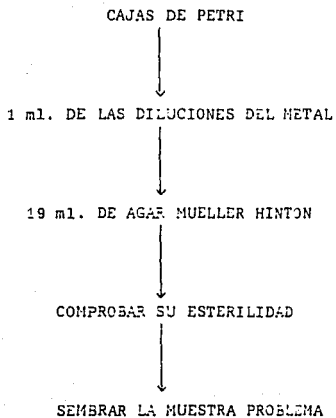
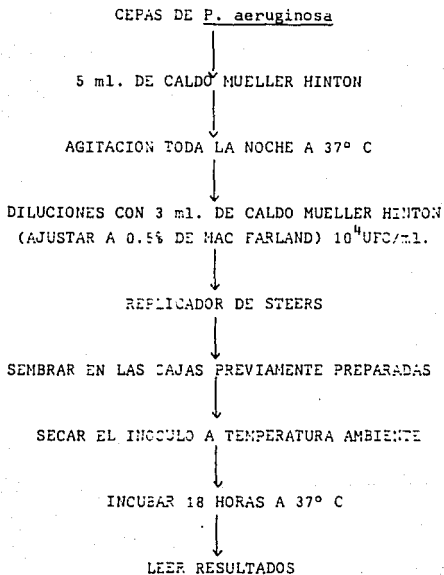


DIAGRAMA DE FLUJO # 2



mercurio, telurito y plata (este rango se estableció tomando como referencia las concentraciones publicadas en los artículos de Márquez y Col., (36) y de Harnett y Col., (18); de 625 a 5,000 microgramos por mililitro para cromo, cobre, níquel, fierro, manganeso, magnesio, zinc, cobalto, cadmio, -- aluminio, arsénico y plomo (el rango utilizado en este caso se modificó con respecto al anterior porque el cien por ciento de -- las cepas fueron resistentes a una concentración de 500 microgramos por mililitro de cada uno de estos metales). Para litio el rango fue de 10,000 a 40,000 microgramos por mililitro (en el caso del litio el rango tuvo que modificarse también porque las cepas fueron resistentes a una concentración de 5,000 microgramos por mililitro).

Se sembraron placas sin solución del metal, para probar la pureza del cultivo y su viabilidad.

La lectura se realizó después de dieciocho horas de incubación a treinta y siete grados centígrados. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó como la con-

centración más baja del ión de metal pesado capaz de inhibir el desarrollo bacteriano.

Las CMI_{50} , CMI_{75} y CMI_{90} , se determinaron - como la concentración más baja del ión de metal pesado capaz de inhibir el cincuenta, setenta y cinco y noventa por ciento, respectivamente, del desarrollo bacteriano.

I I I

R E S U L T A D O S

1). ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE METALES PESADOS
SOBRE CIEN CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de los dieciseis iones de metales pesados, como se observa en la tabla número cinco, puso de manifiesto una variedad de rango de actividad entre ellos, siendo semejante entre telurito y mercurio, formando otro grupo el cobalto, cadmio, níquel, cobre y el fierro, en tanto que el cromo, aluminio, magnesio, zinc y arsénico presentaron el mismo rango de actividad, formándose otro grupo integrado por plomo y manganeso. el rango de actividad más alto fue el presentado por el litio y el más bajo fue el determinado para la plata -- (gráficas número uno a cinco).

Con base en los resultados presentados en la tabla número cinco y en el cuadro número uno, se encontró lo siguiente:

- a) El cien por ciento de las cepas probadas fueron sensibles a la plata (CMI_{90} = 62.5 microgramos

por mililitro).

- b) Por otro lado, el cien por ciento de las cepas fueron resistentes a:

Mercurio (CMI₉₀=500 microgramos por mililitro)

Cobalto (CMI₉₀=1,250 microgramos por mililitro)

Níquel (CMI₉₀=2,500 microgramos por mililitro)

Cromo (CMI₉₀=2,500 microgramos por mililitro)

Zinc (CMI₉₀=5,000 microgramos por mililitro)

Arsénico (CMI₉₀=5,000 microgramos por mililitro)

- c) El veinticinco por ciento de las cepas fueron resistentes a:

Cadmio (CMI₇₅=1,250 microgramos por mililitro)

Plomo (CMI₇₅=2,500 microgramos por mililitro)

- d) El cincuenta por ciento de las cepas fueron resistentes a:

Telurito (CMI₅₀=15.6 microgramos por mililitro)

Aluminio (CMI₅₀=2,500 microgramos por mililitro)

- e) Con los resultados obtenidos para el fierro, magnesio, manganeso y litio, solo se determi

nó la actividad en microgramos por mililitro que nos sirvió para conocer las CMI₅₀, CMI₇₅ y CMI₉₀, como se puede observar en la tabla número cinco y en el cuadro número uno, donde solo se presentan los datos de sensibilidad de P. aeruginosa a doce iones de metales pesados.

T A B L A # 5

ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE METALES PESADOS SOBRE
Pseudomonas aeruginosa AISLADAS DE DIFERENTES FUENTES.

IONES DE METALES PESADOS	ACTIVIDAD ($\mu\text{g/ml.}$)			
	RANGO	CMI ₅₀	CMI ₇₅	CMI ₉₀
Plata	3.90 - 500	15.6	31.25	62.5
Telurito	0.48 - 500	15.6	500	500
Mercurio	0.97 - 500	125	250	500
Cobalto	625 - 2500	625	1250	1250
Calcio	625 - 2500	625	1250	2500
Níquel	625 - 2500	1250	1250	2500
Cobre	625 - 2500	1250	2500	2500
Hierro	625 - 2500	1250	2500	2500
Cromo	625 - 5000	2500	2500	2500
Aluminio	625 - 5000	2500	5000	5000
Magnesio	625 - 5000	2500	5000	5000
Zinc	625 - 5000	2500	5000	5000
Arsénico	625 - 5000	5000	5000	5000
Fluoro	1250 - 5000	1250	2500	5000
Marganeso	1250 - 5000	5000	5000	5000
Litio	10000 - 40000	10000	20000	40000

C U A D R O # 1

Actividad comparativa de iones de metales pesados sobre cepas de Pseudomonas aeruginosa,

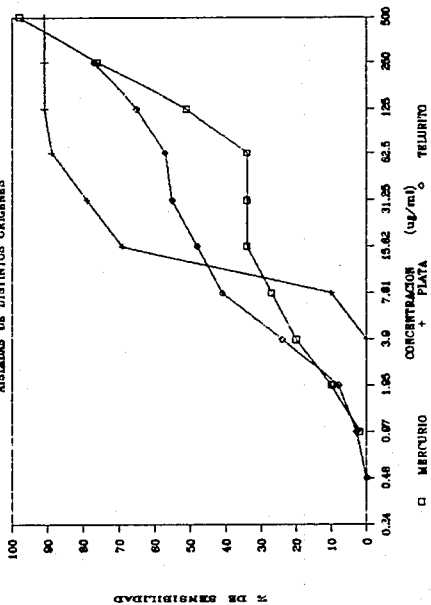
ION DE METAL PESADO	% DE SENSIBILIDAD	REFERENCIA
Plata	100	Márquez y Col. (36)
Telurito	50	Márquez y Col. (36)
Cadmio	75	Márquez y Col. (36)
Plomo	75	Márquez y Col. (36)
Arsénico	0	Harnett y Col. (18)
Aluminio	50	Calomiris y Col. (9)
Zinc	0	Márquez y Col. (36)
Cobalto	0	Harnett y Col. (18)
Cromo	0	Márquez y Col. (36)
Mercurio	0	Harnett y Col. (18)
Níquel	0	Hines y Col. (22)
Cobre	0	Tetaz y Col. (50).

NOTA:

- El porcentaje de sensibilidad de nuestras cepas probadas se determinó tomando como base las concentraciones reportadas en los artículos mencionados en las referencias para cada uno de los iones de metales pesados.
- Cepas obtenidas de distintos orígenes.

GRÁFICA # 1

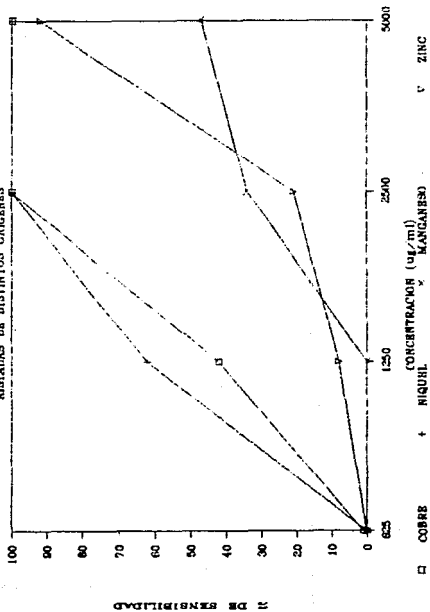
SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*
AISLADAS DE DISTINTOS ORIGENES



GRAFICA # 2

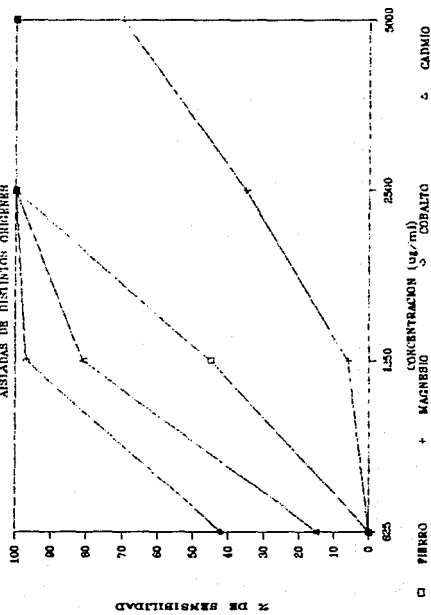
SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*

ASIMILADAS DE DIFERENTES ORIGENES



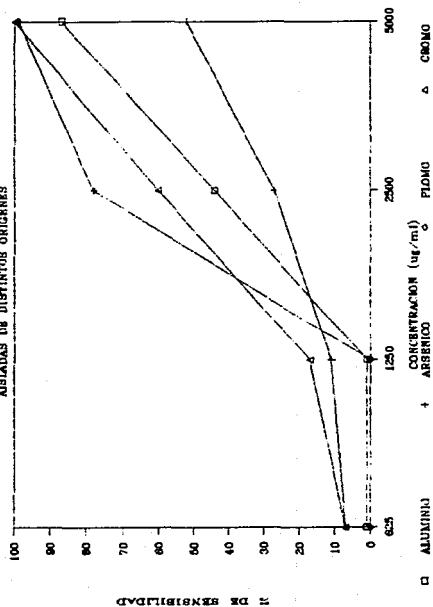
GRAFICA # 3

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*
ASOCIADAS DE DISTINTOS OXIDANTES



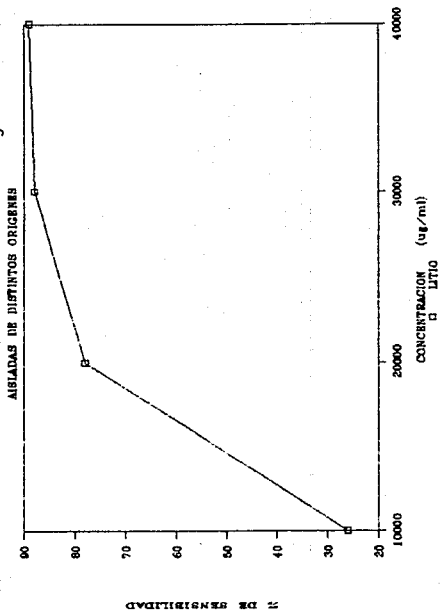
GRAFICA # 4

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*
 AISLADAS DE DISTINTOS ORIGENES



G R A F I C A # 5

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



2). ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE METALES PESADOS
SOBRE CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa AISLADAS DE
DISTINTOS ORIGENES.

De acuerdo con los resultados reportados en las -
tablas números seis, siete y ocho y cuadro número
dos, se puede observar lo siguiente:

- a) El cien por ciento de las cepas obtenidas de
pacientes quemados, con fibrosis quística y -
de ambientes extrahospitalarios fueron sensi-
bles a:

Plata (CMI_{90} =62.5, 15.6 y 125 microgramos por
mililitro, respectivamente).

- b) El cien por ciento de las cepas ya mencionadas,
fueron resistentes a:

Cromo (CMI_{90} =5,000 microgramos por mililitro)

Mercurio (CMI_{90} =250, 500 y 500 microgramos por
mililitro, respectivamente).

Cobalto (CMI_{90} =1,250 microgramos por mililitro)

Zinc (CMI_{90} =5,000, 2,500 y 5,000 microgramos
por mililitro, respectivamente).

Arsénico (CMI_{90} =5,000, 2,500 y 5,000 microgra-
mos por mililitro, respectivamente).

Níquel ($CMI_{90}=2,500$ microgramos por mililitro).

Cobre ($CMI_{90}=2,500, 1,250$ y $2,500$ microgramos por mililitro, respectivamente).

- c) El cien por ciento de las cepas obtenidas de pacientes quemados y con fibrosis quística -- fueron sensibles a:

Cadmio ($CMI_{90}=1,250$ microgramos por mililitro).

Plomo ($CMI_{90}=2,500$ microgramos por mililitro).

- d) El cincuenta por ciento de las cepas obtenidas de pacientes quemados fueron resistentes a:

Aluminio ($CMI_{50}=2,500$ microgramos por mililitro).

Telurito ($CMI_{50}=7.81$ microgramos por mililitro).

Los rangos de actividad de los dieciseis iones de metales pesados sobre cepas de diferentes orígenes se expresan en las tablas números seis, siete y ocho, en orden ascendente y pueden observarse en las gráficas trazadas para cada ión de metal, -- (gráficas números seis a veintiuno).

El rango de actividad que se reporta en la tabla

número cinco es diferente del rango reportado en las tablas números seis, siete y ocho, debido a que la actividad de los iones de metales pesados varía dependiendo del origen de las cepas, a pesar de que el rango de concentraciones que se empleó en la determinación original fue el mismo -- para todas las cepas.

T A B L A # 6

ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE METALES PESADOS SOBRE
Pseudomonas aeruginosa, AISLADAS DE AMBIENTES EXTRA
 HOSPITALARIOS

IONES DE METALES PESADOS	ACTIVIDAD ($\mu\text{g/ml.}$)			
	RANGO	CMI ₅₀	CMI ₇₅	CMI ₉₀
Telurito	1.95 - 500	125	250	500
Plata	3.90 - 500	15.6	31.25	125
Mercurio	3.90 - 500	125	250	500
Cobalto	625 - 5000	625	1250	1250
Cadmio	625 - 5000	1250	1250	2500
Níquel	625 - 5000	1250	2500	2500
Cobre	625 - 5000	1250	2500	2500
Cromo	625 - 5000	2500	2500	5000
Magnesio	625 - 5000	2500	5000	5000
Zinc	625 - 5000	2500	5000	5000
Fierro	1250 - 5000	1250	2500	2500
Arsénico	1250 - 5000	5000	5000	5000
Plomo	1250 - 5000	2500	2500	5000
Aluminio	1250 - 5000	1250	2500	5000
Manganeso	1250 - 5000	5000	5000	5000
Litio	10000 - 40000	20000	40000	40000

T A B L A # 7

ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE METALES PESADOS SOBRE
Pseudomonas aeruginosa AISLADAS DE PACIENTES QUE-
 MADOS

IONES DE METALES PESADOS	ACTIVIDAD ($\mu\text{g}/\text{ml.}$)			
	RANGO	CMI ₅₀	CMI ₇₅	CMI ₉₀
Telurito	0.48 - 500	7.81	125	250
Mercurio	0.97 - 500	125	250	500
Plata	3.90 - 500	15.6	31.25	62.5
Cobalto	625 - 5000	625	1250	1250
Cadmio	625 - 5000	1250	1250	1250
Níquel	625 - 5000	1250	1250	2500
Cobre	625 - 5000	1250	2500	2500
Fierro	625 - 5000	1250	2500	2500
Cromo	625 - 5000	2500	5000	5000
Magnesio	625 - 5000	2500	5000	5000
Zinc	625 - 5000	2500	5000	5000
Arsénico	625 - 5000	2500	5000	5000
Plomo	1250 - 5000	1250	2500	2500
Aluminio	1250 - 5000	2500	5000	5000
Manganeso	1250 - 5000	5000	5000	5000
Litio	10000 - 40000	10000	20000	30000

T A B L A # 8

ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE METALES PESADOS SOBRE

Pseudomonas aeruginosa AISLADAS DE PACIENTES CON

FIBROSIS QUISTICA

IONES DE METALES PESADOS	ACTIVIDAD ($\mu\text{g/ml.}$)			
	RANGO	CMI ₅₀	CMI ₇₅	CMI ₉₀
Mercurio	3.90 - 500	250	500	500
Plata	3.90 - 500	7.81	15.6	15.6
Telurito	62.5 - 500	250	500	500
Cobalto	625 - 5000	625	1250	1250
Cadmio	625 - 5000	625	1250	1250
Níquel	625 - 5000	1250	1250	2500
Cobre	625 - 5000	625	1250	1250
Fierro	625 - 5000	1250	2500	2500
Cromo	625 - 5000	2500	5000	5000
Magnesio	1250 - 5000	2500	2500	5000
Zinc	1250 - 5000	2500	2500	2500
Arsénico	1250 - 5000	2500	2500	2500
Plomo	1250 - 5000	1250	2500	2500
Aluminio	1250 - 5000	2500	2500	5000
Manganeso	1250 - 5000	5000	5000	5000
Litio	10000 - 40000	10000	10000	10000

C U A D R O # 2

ACTIVIDAD COMPARATIVA DE IONES DE METALES PESADOS SOBRE
 CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa DE DISTINTOS ORI
 GENES.

ION DE METAL PESADO	% DE SENSIBILIDAD ORIGEN DE LAS CEPAS			REFERENCIA
	A	PQ	FQ	
Plata	100	100	100	Márquez y Col. (36)
Cadmio	75	100	100	Márquez y Col. (36)
Plomo	75	100	100	Márquez y Col. (36)
Aluminio	75	50	75	Calomiris y Col. (9)
Cromo	0	0	0	Márquez y Col. (36)
Telurito	0	50	0	Márquez y Col. (36)
Mercurio	0	0	0	Harnett y Col. (18)
Cobalto	0	0	0	Harnett y Col. (18)
Zinc	0	0	0	Márquez y Col. (36)
Arsénico	0	0	0	Harnett y Col. (18)
Níquel	0	0	0	Hines y Col. (22)
Cobre	0	0	0	Tetaz y Col. (59)

A.- Cepas obtenidas de ambientes extrahospitalarios.

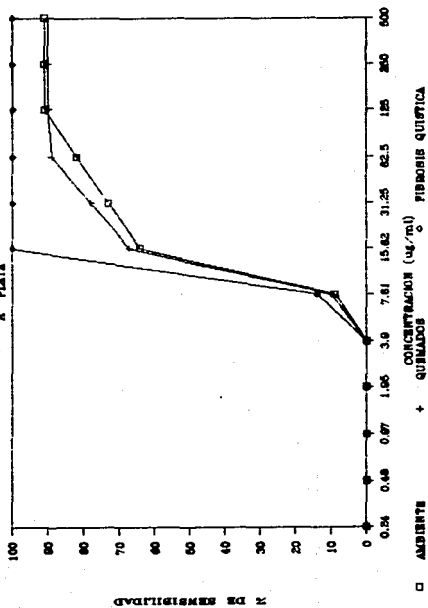
PQ.- Cepas obtenidas de pacientes quemados.

FQ.- Cepas obtenidas de pacientes con fibrosis quística.

NOTA: El porcentaje de sensibilidad de nuestras cepas probadas, se determinó tomando como base las concentraciones reportadas en los artículos mencionados en las referencias para cada uno de los iones de metales pesados.

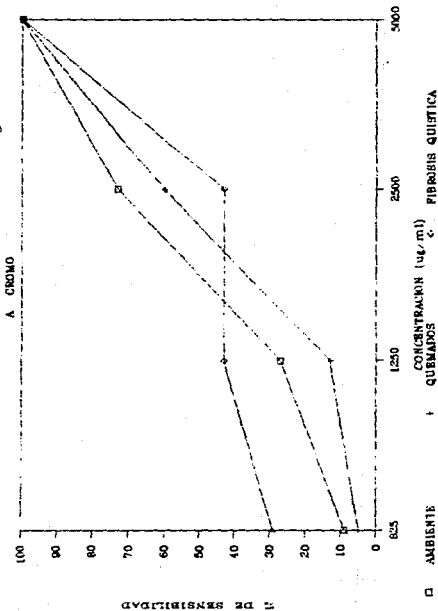
GRAFICA # 6

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



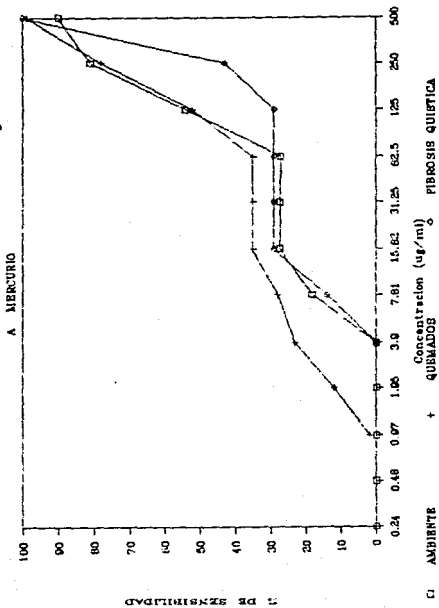
GRAFICA # 7

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



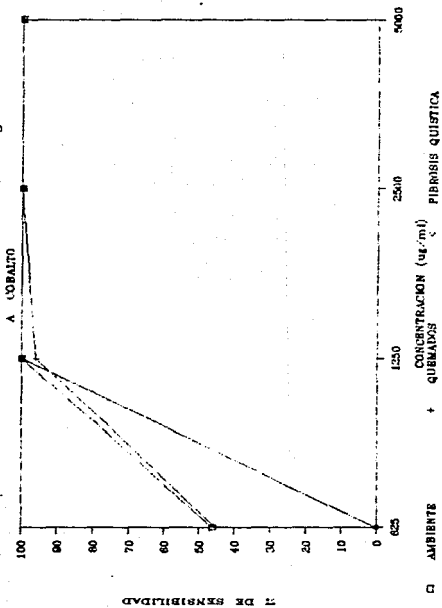
GRÁFICA # 8

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



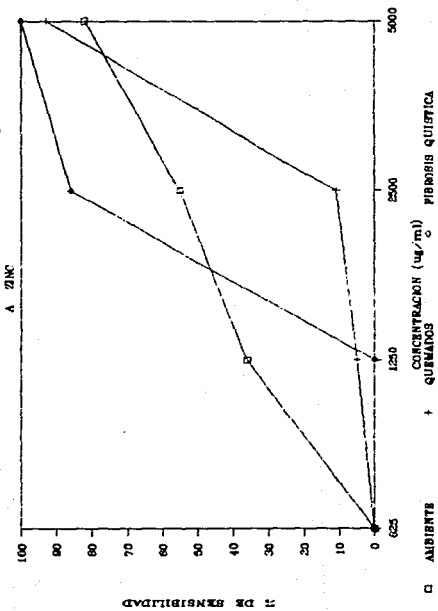
G E A F I C A // 9

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*

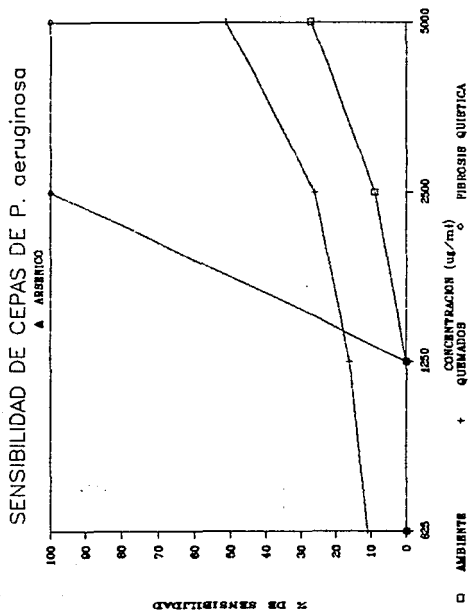


G R A F I C A # 10

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE P. aeruginosa



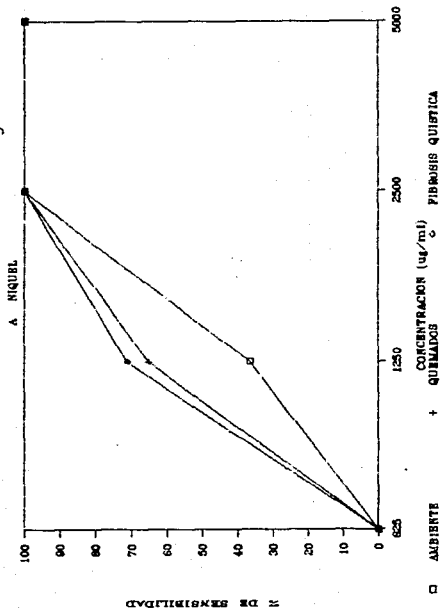
GRÁFICA # 11



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

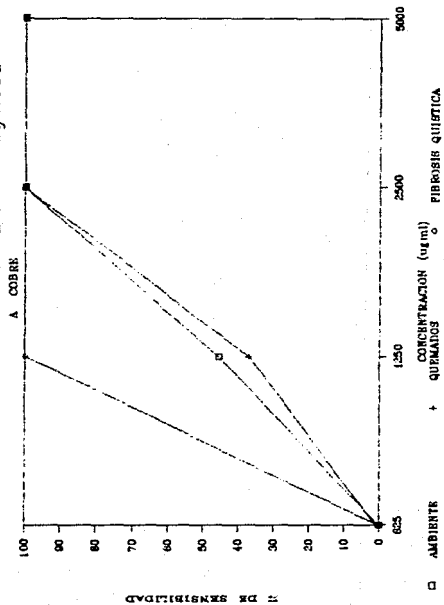
GRAFICA # 12

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



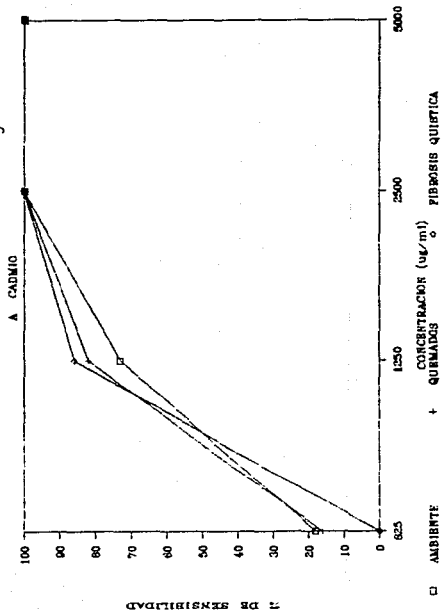
GRAFICA # 13

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



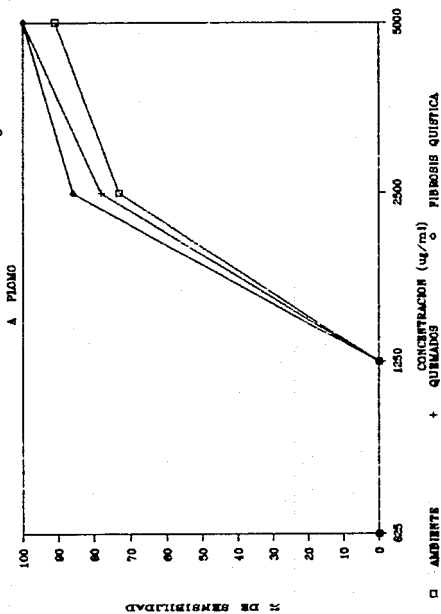
GRÁFICA # 14

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



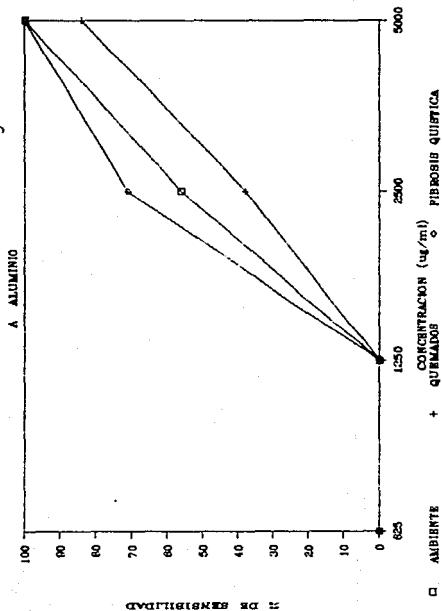
GRAFICA # 15

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*

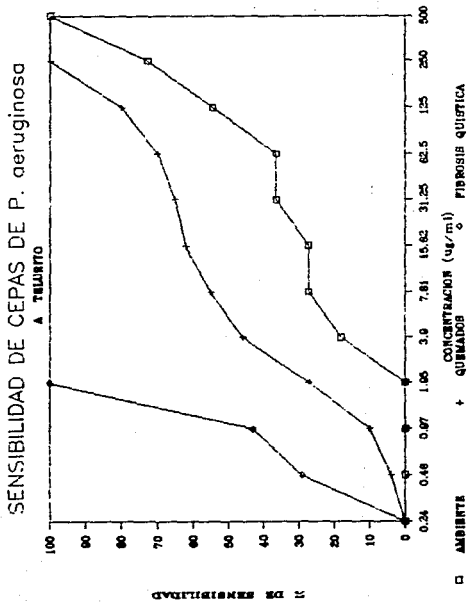


GRAFICA # 16

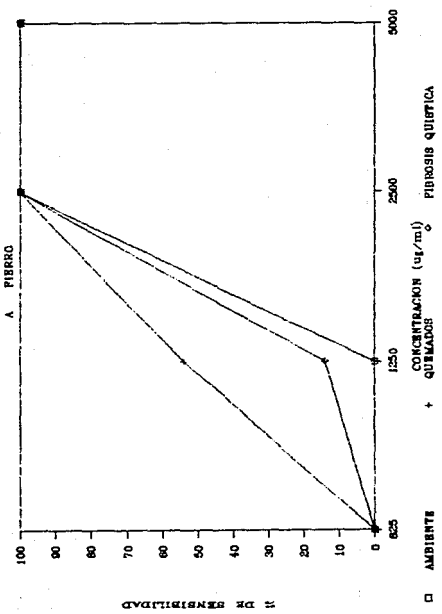
SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



G.R.A.F.I.C.A # 17

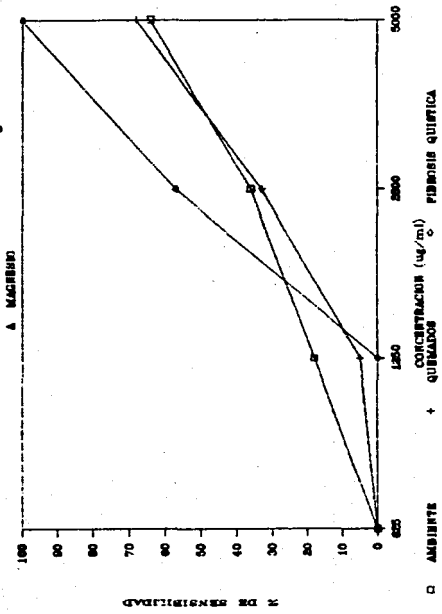


SENSIBILIDAD DE CEPAS DE P. aeruginosa



GRAFICA # 19

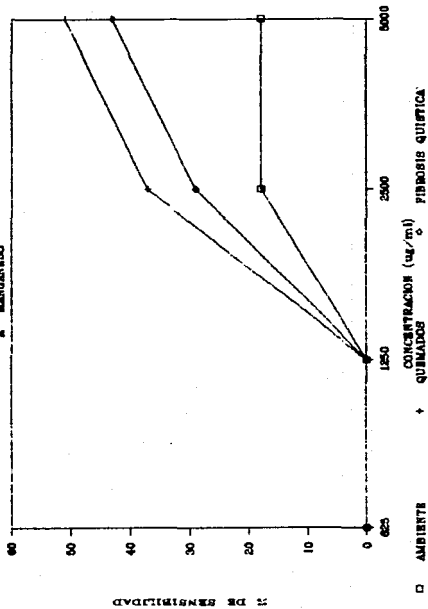
SENSIBILIDAD DE CEPAS DE P. aeruginosa



QUINOLONAS CUATERNARIAS

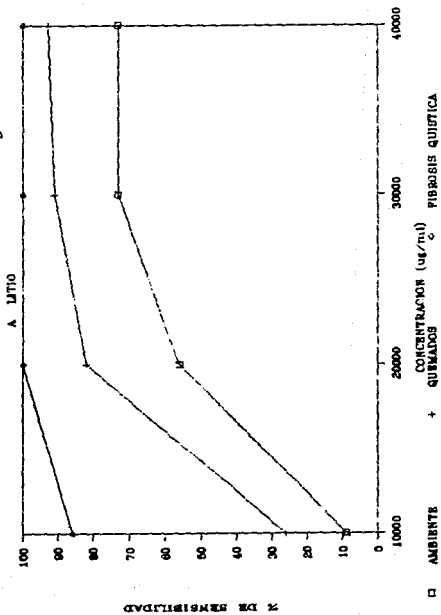
GRAFICA # 20

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*
A MANGANEZO



GRÁFICA # 21

SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *P. aeruginosa*



D I S C U S I O N D E R E S U L T A D O S

En el presente trabajo de acuerdo a los resultados referidos en la tabla número dos, encontramos dos grupos formados en base al por ciento de la sensibilidad y tomando en consideración los datos mencionados por Márquez (36), Calomiris (9), Harnett (18), Hines (22), y Tetaz (59). El primer grupo se encuentra formado por una alta frecuencia de sensibilidad de las cepas a plata, cadmio, plomo y aluminio. El segundo grupo se integra por una alta frecuencia de tolerancia a cromo, telurito, mercurio, cobalto, zinc, arsénico, níquel y cobre.

En el caso de la plata, se ha mencionado que la utilización de algunos compuestos de este metal en pacientes con quemaduras de segundo y tercer grado, quienes requieren tratamiento local y sistémico, ha traído como consecuencia el aislamiento tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas tolerantes a dicho metal. De las cepas de P. aeruginosa estudiadas, ninguna de ellas fue tolerante a la plata como consecuencia de que a estos pacientes no se les sometió a dicho tratamiento y, por lo tanto, no hubo selección de variantes tolerantes. Debemos considerar que este tipo de variantes también se han aislado de muestreos realizados a nivel de ríos contaminados con desechos provenientes de industrias que utilizan a la plata como materia prima.

En el caso del cadmio, aproximadamente el noventa por ciento de las cepas estudiadas fueron sensibles (cuadro número uno y dos), lo cual podría explicarse porque existe una elevada penetración de este ión en el interior de la célula, que --traería como consecuencia su muerte por efecto tóxico, ante la incapacidad de poder metabolizarlo, caso que no sucede en aquellos microorganismos portadores de material genético extracromosomal que interviene en la tolerancia al mismo metal.

Como ya se mencionó anteriormente, el zinc es un oligo elemento necesario para la formación de algunas enzimas bacterianas, pero a concentraciones muy elevadas puede inhibir el crecimiento de algunos microorganismos. En el presente trabajo se observó que el cien por ciento de las cepas fueron tolerantes a elevadas concentraciones de dicho metal, independientemente de su origen, lo cual podría deberse a que la concentración de zinc en el medio ambiente se eleva constantemente, como ha podido detectarse en lugares cercanos a fundidoras, suelos, mares, ríos, sedimentos y aguas de riego, lo cual ocasiona la acumulación del metal en plantas y peces de consumo humano. Entre los mecanismos involucrados en esta resistencia, probablemente se encuentran: El desarrollo de plásmidos que codifican la resistencia tanto al zinc como al cadmio, lo cual ya se ha demostrado en algunas especies bacterianas y también podría deberse a la presencia de un ácido graso (ac. w-ciclohexil undecanoico) en la membrana celular de algunas bacterias

resistentes a este metal y que no se observa en las bacterias sensibles.

En lo que se refiere al plomo, encontramos que el cien por ciento de las cepas aisladas de pacientes quemados y con - fibrosis quística fueron sensibles a este metal, probablemente debido a que estas bacterias no habían estado en contacto con él. Sin embargo, el veinticinco por ciento de las cepas aisladas de ambientes extrahospitalarios fueron tolerantes al plomo, esto pudo deberse a que este metal se encuentra ampliamente -- distribuido en la naturaleza y además lo podemos encontrar como contaminante ambiental, lo cual pudo generar el desarrollo de mecanismos de resistencia al plomo en estas bacterias. Algunos de los mecanismos de resistencia que se han estudiado -- hasta ahora son: La capacidad de algunos microorganismos de - transformarlo en compuestos volátiles como el tetrametilo de - plomo; otros microorganismos pueden inmovilizar el plomo cuando éste penetra en la célula y de esta manera neutralizar su - efecto tóxico; además, se sabe que la tolerancia al plomo también se encuentra codificada por plásmidos.

Con respecto al mercurio, el cien por ciento de las cepas, independientemente de su origen, fueron resistentes probablemente debido a que se encuentra como contaminante ambiental. La resistencia que presentaron las cepas al mercurio, probablemente involucra mecanismos como la reducción enzimática del -- ión a mercurio volátil, el cual es menos tóxico, o la transfor

codifica la resistencia a agentes antimicrobianos.

Con respecto al cobre, el cien por ciento de las cepas estudiadas fueron resistentes a dicho metal, lo cual se explica porque las sales de cobre se utilizan frecuentemente en la agricultura como fungicidas, y esto provoca su acumulación en el suelo y vegetales, también se han detectado altas concentraciones de este metal en lugares cercanos a las refineras de petróleo como la de Coatzacoalcos, Ver. Todo esto permite que los microorganismos estén frecuentemente en contacto con las sales de cobre y que desarrollen mecanismos de resistencia como la presencia de plásmidos que les confieren elevada tolerancia a este metal.

En cuanto al telurito, el cien por ciento de las cepas aisladas de ambientes extrahospitalarios y de pacientes quemados, fueron resistentes, en tanto que el cincuenta por ciento de las cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística fueron sensibles. Esto pudo deberse a que las cepas obtenidas de pacientes con fibrosis quística no habían estado en contacto con este metal y por lo tanto no habían desarrollado mecanismos de resistencia frente a él. Ya se ha demostrado que la resistencia al telurito está codificada por plásmidos y el mecanismo involucrado en esta resistencia es la reducción del telurito a telurio metálico, la cual se lleva a cabo a través de grupos sulfhidrilos, con la incorporación posterior del telurio

a la metionina y posiblemente a la cisteína; además, se ha encontrado que las enzimas telurito reductasa y malato deshidrogenasa son indispensables para la reducción del telurio por este método, otro mecanismo de resistencia es la metilación del telurio, la cual es inducida por el selenio.

En cuanto al arsénico, el cien por ciento de las cepas fueron resistentes, probablemente debido a que con frecuencia se encuentra en el ambiente ocasionando graves problemas en la flora y la fauna, así como en la salud pública. Este metal -- puede ser transformado por los microorganismos en compuestos -- menos tóxicos, lo que constituye un mecanismo de tolerancia y desintoxicación para ellos, presentando además resistencia a -- agentes antimicrobianos. En medios acuáticos, el arsénico -- generalmente se encuentra en forma de arsenito y arsenato. El -- arsenito es degradado por algunos microorganismos debido a una mutación espontánea o por la transferencia de plásmidos R, los cuales además pueden codificar la expulsión del arsenito y arsenato de la célula.

En lo que se refiere al aluminio, el setenta y cinco -- por ciento de las cepas aisladas de ambientes extrahospitalarios y de pacientes con fibrosis quística fueron sensibles y sólo el cincuenta por ciento de las cepas aisladas de pacientes quemados fueron sensibles a dicho metal. Esto podría deberse a que la bacteria había estado en contacto previamente -- con el aluminio que se encuentra en la naturaleza debido a la

contaminación ambiental, aunque los mecanismos involucrados en dicha tolerancia no se conocen con exactitud.

Con respecto al fierro, magnesio, manganeso y litio, - no se pudo determinar la resistencia tomando como referencia - las concentraciones reportadas por otros investigadores, debido a que no se encuentran datos en la literatura, por lo que - sólo se puede afirmar que las cepas obtenidas de pacientes que quemados, con fibrosis quística y de ambientes extrahospitalarios requirieron para lograr la CMI_{50} para fierro, 1,250 microgramos por mililitro y cantidades superiores a 2,500 microgramos por mililitro fueron necesarias para la CMI_{90} . Para el magnesio, la CMI_{50} se logró con 2,500 microgramos por mililitro y 5,000 microgramos por mililitro para obtener la CMI_{90} . Para el manganeso, tanto la CMI_{50} como la CMI_{90} se obtuvieron con - 5,000 microgramos por mililitro. En el caso del litio, para las cepas obtenidas de pacientes quemados se requirieron, - - 10,000 microgramos por mililitro para la CMI_{50} y 30,000 microgramos por mililitro para la CMI_{90} , en tanto que para las cepas obtenidas de pacientes con fibrosis quística las CMI_{50} y CMI_{90} fueron de 10,000 microgramos por mililitro y para las cepas -- obtenidas de ambientes extrahospitalarios la CMI_{50} se alcanzó con una concentración de 20,000 microgramos por mililitro y la CMI_{90} con 40,000 microgramos por mililitro.

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos en -

el presente trabajo podríamos inferir que la presión selectiva a la que se encuentran sometidas las bacterias como consecuencia de la contaminación ambiental existente en la Ciudad de -- México, es un hecho. Sin embargo, este dato podría demostrarse completamente a través del estudio genético de las cepas -- estudiadas.

V

C O N C L U S I O N E S

- 1). Todas las cepas de P. aeruginosa de distintos orígenes, fueron sensibles a plata.
- 2). El cien por ciento de las cepas obtenidas de pa--cientes fueron sensibles a cadmio y al plomo y --solo un veinticinco por ciento de las de origen -extrahospitalario lo fueron a los mismos metales.
- 3). El setenta y cinco por ciento de las cepas aisla--das de ambientes extrahospitalarios y de pacientes con fibrosis quística fueron sensibles al aluminio y solo el cincuenta por ciento de las cepas aisla--das de pacientes quemados fueron sensibles a di--cho metal.
- 4). El cincuenta por ciento de las cepas aisladas úni--camente de pacientes quemados, resultaron sensi--bles al telurito.
- 5). El cien por ciento de las cepas fue resistente al cromo, mercurio, cobalto, zinc, arsénico, níquel y cobre.
- 6). En vista de que se carece de cifras comparativas

para decidir la tolerancia en las cepas sometidas al fierro, magnesio, manganeso y litio sólo se -- menciona la CMI 50, 75 y 90 determinada.

- 7). La mayoría de las cepas de P. aeruginosa, independientemente de su origen, presentan una alta tolerancia a los iones de metales pesados estudiados, lo cual nos inclina a pensar en la selección de -- variantes tolerantes que se está llevando a cabo en el ambiente.
- 8). Los mecanismos que emplean los microorganismos -- para la transformación de metales pesados, involucra la presencia de plásmidos que, además, codifican la resistencia frente a los agentes antimicrobianos.

V I

P E R S P E C T I V A S D E L T R A B A J O

Se considera que, para que este trabajo se encuentre totalmente terminado, es necesaria la realización de pruebas que confirmen la presencia de plásmidos que codifiquen para la tolerancia a iones de metales pesados.

B I B L I O G R A F I . .

- 1). Arima, K and Beppu, M.- "Induction and Mechanisms
or Arsenite Resistance in Pseudomonas pseudomallei.
Journal of Bacteriology.- 88/1/143-150 (1964).
- 2). Artz, A.B., Moncrief, J.A., and Pruitt, B.A.
"Burns. A team Approach"
W.B. Saunders Co.
Philadelphia, Londres, Toronto (1979).
- 3). Austin, B. Allen D.A., Mills A.L., and Colwell,
R.R.- "Numerical Taxonomy of Heavy Metal-Tolerant
Bacteria Isolated from an Estuary".- Canadian Jour
nal Microbiology.- 23/1433-1447.(1977).
- 4). Babich, H., and Stotzky, G. "Toxicity of Zinc to
Fungi, Bacteria, and Coliphages: Influence of
Chloride Ions".- Applied and Environmental -
Microbiology.- 36/6-906-914. (1978).
- 5). Bartholomew, W.G., and Pfaender, K.F.- "Influence
of Spatial and Temporal Variations on Organic - -
Pollutant Biodegradation Rates in an Estuarine
Environment".- Applied and Environmental Microbio-
logy.- 45/1/103-109. (1983).

- 6). Bennett, F.L., and, M.H., Malamy,- "Arsenate - - Resistant Mutants of Escherichia coli and Phosphate Transport".- Biochemical and Biophysical - - Research Communications.- 40/496-503. (1970).
- 7). Bopp, L.H., Chakrabarty, A.M., and Ehrlich, H.L.- "Chromate Resistance Plasmid in Pseudomonas - - fluorescens".- Journal of Bacteriology.- 155/3/ - 1105-1109. (1983).
- 8). Calcott, H.P.- "Transient Loss of Plasmid-Mediated Mercuric Ion Resistance After Stress in Pseudomonas aeruginosa".- Applied and Environmental Microbiology.- 41/6/1348-1354. (1981).
- 9). Calomiris, J.J., Armstrong, L.J., and Seidler, -- J.R.- "Association of Metal Tolerance with Multiple Antibiotic Resistance of Bacterial Isolated - from Drinking Water".- Applied and Environmental Microbiology.- 47/6/1238-1242. (1984)
- 10). Díaz, A.M.G.
"Determinación de Metales Pesados en Fracciones de Polvo Atmosférico".
Tesis Profesional
E.N.C.B., I.P.N. (1986).

- 11). Duxbury, T.- "Toxicity of Heavy Metals to Soil Bacteria".- FEMS Microbiology Letters.- 11/217-220. (1981).
- 12). Dyke, K.G.H., Perker, M.T. and Richmond, M.H.- "Penicillinase Production and Metal ion Resistance in Staphylococcus aureus Cultures Isolated from Hospital Patients".- Journal of Medical Microbiology.- 3/125-136. (1970).
- 13). Forstner, V., and G.T., Wittmann
"Metal Pollution in the Aquatic Environment"
Ed. Springer-Verlag.
Berlin, Heidelberg, Germany. (1979).
- 14). Foster, T.J.- "Plasmid-Determined Resistance -- to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria".- Microbiological Reviews.- 47/3/361-409. (1983).
- 15). Ferguson, J.F., and J., Gams.- "A Review of the Arsenic Cycle in Natural Waters".- Water Research, 6/1259-1274. (1972).

- 16). G. Tyler Miller, Jr.
"Living in the Environment"
2a. Edición.
Wadsworth Publishing Co.
Belmont, California (1979).
- 17). Hallas, E.L., Thayer, S.J., and Cooney, J.J.- -
"Factors Affecting the Toxic Effect of Tin on -
Estuarine Microorganisms".- Applied and Environ
mental Microbiology.- 44/1-193-197. (1982).
- 18). Harnett, M.N., and Gyles, L.C.- "Resistance to
Drugs and Heavy Metals, Colicin Production, --
and Biochemical Characteristics of Selected Bovi
ne and Porcine Strains".- Applied and Environ--
mental Microbiology. 48/5/930-935. (1984).
- 19). Hedges, R.W. and Baumberg, S.- "Resistance to -
Arsenic Compounds Conferred by a Plasmid - -
Transmissible Between Strains of Escherichia --
coli.- Journal of Bacteriology.- 115/1/459-460.
(1973).
- 20). Hernández, R.T.
"Estudio Sobre los Principales Tóxicos Contami-
nantes, sus Fuentes y Efectos sobre la Salud.
Tesis Profesional.
Fac. de Quím., U.N.A.M. México. (1976).

- 21). Hicks, G.E.A.
"Variación Estacional en la Concentración de --
Elementos Metálicos en Ostiones de la Laguna de
Términos, Campeche, México".
Fac. de Química, U.N.A.M. México (1976)
- 22). Hines, E.M., and Jones, E.G. "Microbial Metal -
Tolerance in Bermuda Carbonate Sediments". - -
Applied and Environmental Microbiology. 44/2/
502-505. (1982).
- 23). Ishihara, M., Kamio, Y. and Tarawaki, Y. - - -
"Cupric Ion Resistance as a New Genetic Marker
of a Temperature Sensitive R. Plasmid, R T₅₁ in
Escherichia coli". Biochemical and Biophysical-
Research Communications. 82/1/74-80. (1978).
- 24). Iterson, V., W., and W., Loene.- "Cytochemical
Localization of Reductive Sites in a Gram Posi-
tive Bacterium".- The Journal of Cell Biology.
20/361-375. (1964).
- 25). Iterson, V., W., and W., Loene.- "A Cytochemi-
cal Localization of Reductive Sites in a Gram--
Negative Bacterium".- The Journal of Cell Biolo-
gy. 20/377-387. (1964).

- 26). Jordan, M., and Lechevalier, M., P.- "Effects of Zinc Smelter Emissions on Forest Soil Microflora".- Canadian Journal Microbiology. 21/1855-1865. (1975).
- 27). Kaur, P., and, Vadhera, D., V.- "Mechanisms of Resistance to Silver Ions in Klebsiella pneumoniae".- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 29/1/165-167. (1986).
- 28). Kondo, I., Ishikawa, T., and Nakahara H.- "Mercury and Cadmium Resistances Mediated by the Penicillinase Plasmid in Staphylococcus aureus". Journal of Bacteriology. 117/1/1-7. (1974).
- 29). Kozak, S., and Forsberg, W., C.- "Transformation of Mercuric Chloride and Methylmercury by the Rumen Microflora".- Applied and Environmental Microbiology. 38/4/626-636. (1979).
- 30). Krieg, R., N., Holt, G., H.- "Bergeys Manual of Sistematic Bacteriology".
Vol. 1. Sans Tache.
Baltimore/London (1984).
- 31). Kurek, E.W.A., Czaban, J., and Bollag, J.M.- "Sorption of Cadmium by Microorganism in Competition with Other Soil Constituents".- Applied-

- and Environmental Microbiology. 43/5/1011-1015.
(1982).
- 32). Laddaga, R., A., Bessen, R., and Silver, S.- -
"Cadmium- Resistant Mutant of Bacillus subtilis
168 Sith Reduced Cadmium Transport". Journal of
Bacteriology. 162/3/1106-1110. (1985).
- 33). Lamanna, C., Mallette, F., M., Zimmerman, N., L.
"Basic Bacteriology".
Cuarta Edición.
The Williams and Wilkins Company/Baltimore.
(1973).
- 34). Lennette, E., H., Balow, E., Hausler, Jr., W.L.
and Shadomy, H., L.
Manual of Clinical Microbiology.
Fourth Edition.
American Society for Microbiology, Washington,
D. C. (1985).
- 35). López, G., L.
"Determinación de Algunos Metales en Fracciones
de Partículas en la Atmósfera de la Escuela Na-
cional de Ciencias Biológicas".
Tesis Profesional.
E.N.C.B. I.P.N. México (1985).

- 36). Márquez, M., A., Congregado, F., and Simon Pujol, M., D.- "Antibiotic and Heavy Metal Resistance of Pseudomonas aeruginosa Isolated from - Soils". Journal Applied Bacteriology. 47/347-350 (1979).
- 37). Mc. Intyre-Mills.
"Ecological Toxicology Research".
Editorial Plenum (1975).
- 38). Mitra, R., S.- "Protein Synthesis in Escheri -- chia coli During Recovery from Exposure to Low-Levels of Cd^{2+} ". Applied Environmental Microbiology. 47/1012-1016. (1984).
- 39). Mobley, H., L., T., and Rosen, B., P.- "Energetics of Plasmid Mediated Arsenated Resistance in Escherichia coli". Proc. Natl. Acad. Sci. -- USA. 79/6119-6122.(1982).
- 40). Morales, P., I.
"Determinación de los Elementos Pesados más -- Importantes Como Agentes de Contaminación Atmosférica por el Método de Espectrofotometría de -- Absorción Atómica y sus Efectos en la Salud del Hombre".
Tesis Profesional.
Facultad de Química, U.N.A.M. México (1980).

- 41). Morton, H., E., and Anderson, T., F.- "Electron Microscopic Studies of Biological Reactions. 1. Reduction of Potassium Tellurite by Corynebacterium diphtheriae". Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 64/272-276. (1979).
- 42). Nakahara, H., Ishikawa, T., Sarai, Y., Kondo I. Kosukue, H., and Silver. S.- "Linkage of Mercury, Cadmium and Arsenate and Drug Resistance in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa". -- Applied and Environmental Microbiology. 33/4/975-976.(1977).
- 43). Nieto, J., J., A., Ventosa and Ruiz-Baraquero,- F. Applied Environmental Microbiology. 53/1199--1209.(1987).
- 44). Novick, R., P., and Roth, Ch.- "Plasmid-Linked Resistance to Inorganic Salts in Staphylococcus aureus". Journal of Bacteriology. 95/1335-1342. (1968).
- 45). Olson, H., B., Barkay, T., and Colwell, R., R.- "Role of Plasmide in Mercury Transformation by Bacteria Isolated from the Aquatic Environment" Applied Environmental Microbiology. 38/3/478--485. (1979).
- 46). Osuna-Paez, F., Botello, V., A., and Villanue-

- va, S.- "Heavy Metals in Coatzacoalcos Estuary and Ostion Lagoon, México". Marine Pollution Bulletin. 17/516-518. (1986).
- 47). Pereira, B". M". E". Defussi, N.
"Aspectos Toxicológicos de Agentes Químicos".
Oficina Sanitaria Panamericana.
Metepac, México. (1986).
- 48). Perry, R., D., and Silver, S.- "Cadmium and Manganese Transport in Staphylococcus aureus Membrane Vesicles". Journal of Bacteriology. 150/2/ - 973- 976. (1982).
- 49). Scheurs, A., I., W., and Rosemberg H., "Effect of Silver on Transport and Retention of Phosphate by Escherichia coli". Journal of Bacteriology. 152/7-13.(1982).
- 50). Ridley, P., W., L., J., and Wood J., M., "Biomethylation of Toxic Elements in the Environmental". Science. 187/329-332.(1977).
- 51). Schidnt, U., and Huber, F.- "Methylation of Organolead and Lead (III) Compound to $(CH_3)_4 Pb$ by Microorganisms". Nature. 259/157-158.(1976).

- 52.) Sentfies, P., E.
"Contaminantes Metálicos en organismos Marinos"
Tesis Profesional.
Facultad de Química. U.N.A.M. México. (1976).
- 53.) Silver, S., Leaby, K., M., Shaw, W., V., Hammond,
D., Novick, R., P., Wilsky, G., R., Malamy, M.,
H., and, Rosemberg, H.- "Inducible Plasmid De -
termined Resistance to Arsenate, Arsenite and -
Antimony (III) in Escherichia coli and Staphylo
coccus aureus". Journal of Bacteriology. 146/ -
983-996. (1981).
- 54.) Silver, S. and Misra T., K.
"Bacterial Transformation of and Resistances to
Heavy Metals".
Plenum Press. (1985).
- 55.) Steveninck, Van, J.- "The influence of Nichelous
Ions in Carbohidrate Transport in Yeast Cells".
Biochemical and Biophysical Acta.126/154-162.
(1966).
- 56.) Strandberg, W., G., Shumate, E., S., and Parrott
R., J., Jr. "Microbial Cells as Biosorbents for
Heavy Metals: accumulation of Uranium by Saccharo-
mysces cerevisiae and Pseudomonas aeruginosa".
Applied and Enviromental Microbiology. 41/1/--
237-245. (1981).

- 57). Summers, A., O., and Silver S.- "Microbial - - Transformation of Metals". Annual Review of - Microbiology. 32/637-672. (1978).
- 58). Summers, A., O., and Jacoby, A., G.- "Plasmid-Determined Resistance To Tellurium Compounds. Journal of Bacteriology. 129/276-281. (1977).
- 59.- Tetaz, T., J., and Luke, R., K., J.- "Plasmid Controlled Resistance to Copper in Escherichia coli". Journal of Bacteriology. 154/1263-1268. (1983).
- 60). Timoney, F., J., Port, J., Giles, J., and - - Spanier, J. "Heavy Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sediments of New - York Bight". Applied and Environmental Microbiology. 36/3/465-472. (1978).
- 61). Vizcaino Murray, Francisco.
"La Contaminación en México".
Primera Edición.
Fondo de Cultura Económica. México, D.F. (1975).
- 62). Webb, M. "The Mechanism of Acquired Resistance to Co^{2+} and Ni^{2+} in Gram Positive and Gram Negative Bacteria". Biochimica et Biophysica Acta. 222/440-446. (1970).
- 63). Webb, M. "Interrelationships Between the Utilization of Magnesium and the Uptake of the Other

- Bivalent Cations by Bacteria". Biochemical and -
Biophysical. Acta. 222/428-439. (1970).
- 64). Weiss, A., A., Silver, S., and Kinscherf, T., G.
"Cation Transport Alteration Associated with -
Plasmid-Determined Resistance to Cadmium in - -
Staphylococcus aureus". Antimicrobial and Chemo
therapy. 14/856-865. (1978).
- 65). Williams, W., J., and Silver Simon. - "Bacterial
Resistance and Detoxification of Heavy Metals".
Enzyme and Microbial Technology. 6/12/529-576.
(1984).
- 66). Wood, J., M. "Biological Cycles for Toxic Ele- -
ments in the Environment". Science. 183/1049- 1052
(1974).
- 67). "El Estado del Medio Ambiente".
Folleto de la Secretaría de Salubridad y Asisten
cia, Subsecretaría de Mejoramiento del Ambiente
Talleres Gráficos de la Nación. México, D. F.
(1981).