

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA.



Determinación de la resistencia a metales pesados en cepas de
Aeromonas hydrophila aisladas del tubo digestivo de *Chirotostoma*
humboldtianum.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIÓLOGO.
P R E S E N T A :
DAVID GODINEZ GARCIA

DIRECTORA DE TESIS: M en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS.

TLALNEPANTLA. ESTADO DE MEXICO

DICIEMBRE 2007

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

*"Ni la flor que abre su
matizada corola al resplandor del
sol, ni el lago cuya tranquilidad
pureza retrata el azul firmamento,
ni el ave que vuela entre los rayos
de luz, ni el árbol que ostenta
bajo un cielo primaveral su
pomposa corona de flores, ni el
manantial que arrastra arenas de
oro reflejando en sus limpias
ondas la belleza de sus márgenes,
ninguna cosa creada, en fin,
puede infundir deleite semejante
al que despierta en el alma la
culminación de un trabajo."*

S. Rusiñol.

Dedicatorias.

A mis padres: David Godinez Herrera y Elvia García Blancas con mucho amor y gratitud por sus sacrificios, su confianza, apoyo y dedicación que me brindaron.

A Lilia Josefina Zacarias Martínez por su amor y apoyo incondicional.

Y a Dios por darme la vida y permitirme acabar mi Licenciatura.



Agradecimientos.

A la M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras por brindarme todo lo necesario para la realización de esta tesis. También por ser para mí un ejemplo de disciplina y dedicación al trabajo. Gracias por su confianza y amistad.

Al M en C. Eric Monroy Perez por sus enseñanzas y consejos oportunos en la construcción de este trabajo, así como, su amistad y tiempo incondicional.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco por sus consejos y tiempo en la revisión de esta tesis, además, de su apoyo a la carrera de Biología.

Al M en C. Sergio Chazaro Olvera por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por apoyar para que los biólogos se titulen.

A la Biol. Susana E. González Almazán sus consejos y tiempo en la revisión de esta tesis.



INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
Características morfológicas de <i>Aeromonas sp.</i>	
Distribución geográfica y epidemiología	
Resistencia bacteriana a antibióticos	
Mecanismos de resistencia a los antibióticos.	
Resistencia a antibióticos y metales pesados	
Interacción de las bacterias con los metales	
Mecanismos de resistencia a metales pesados	
Arsénico	
Cadmio	
Cobalto Níquel y Zinc	
Cobre	
Cromo	
Mercurio	
Plata	
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y METODOS	22
Resistencia a antibióticos	
Determinación de la CMI a metales pesados	
Clasificación de la resistencia a metales pesados.	
RESULTADOS.	27
Resistencia a antibióticos por <i>Aeromonas hydrophila</i> .	
Resistencia a metales pesados por <i>Aeromonas hydrophila</i> .	
DISCUSIÓN.	36
Resistencia a antibióticos.	
Resistencia a metales pesados.	
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS.	42

RESUMEN.

Palabras Clave: Resistencia, plásmidos, metales.

En los últimos años el uso indiscriminado de los antimicrobianos ha seleccionado bacterias resistentes tanto a antibióticos como a metales pesados. Los mecanismos de resistencia a algunos metales pesados han sido esclarecidos, sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo de resistencia bacteriano a plomo. El objetivo de este trabajo fue determinar la resistencia a plomo, mercurio, cromato, zinc, plata y arsenito en 20 cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas del tracto digestivo de *Chirotoma humboldtianum*. La Concentración Mínima Inhibitoria a metales pesados se realizó por el método de dilución en placa. El total de las cepas analizadas fue resistente a plomo (CMI = 1600-3200 $\mu\text{g/ml}$) y a mercurio (CMI = 10-40 $\mu\text{g/ml}$). El 100 por ciento de las cepas fue sensible a cromato (CMI = 93.5-187 $\mu\text{g/ml}$), zinc (CMI = 21.2-42.5 $\mu\text{g/ml}$), plata (CMI = 0.625-2.5 $\mu\text{g/ml}$) y arsenito (CMI = 200-400 $\mu\text{g/ml}$). Debido a que todas las cepas de *Aeromonas hydrophila* analizadas en este trabajo fue resistente a plomo, es recomendable la extracción y el análisis de los plásmidos de estas bacterias con el propósito de establecer si la resistencia a este metal se encuentra conferida por ellos o si dicha resistencia al metal está codificada por el cromosoma bacteriano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El charal (*Chirostoma humboldtianum*) cuenta con una amplia tradición en México, pues desde la época prehispánica han sido consumidos en forma de guisados, como tamal, asados, fritos, en torta y secos (Sierra y Sierra 1977; Ocampo 1971).

Sin embargo, la alimentación humana con este tipo de pescados podría representar un serio problema de salud para los consumidores si el tiempo de cocción no es el adecuado, debido a que se ha descrito que bacterias del género *Aeromonas sp.* son comensales del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum* (Trust, 1975; Ringo *et al.*, 1999).

Características morfológicas de *Aeromonas sp.*

El género *Aeromonas* comprende 4 especies; *A. caviae*, *A. sobria*, *A. salmonicida* y *A. hydrophila*. Esta última es la especie aislada con más frecuencia la cual se caracteriza por ser bacilos rectos Gram negativos con extremos redondeados o coroides, de 0.3 a 1.0 μm de diámetro y 1.0 a 3.5 μm de largo. Pueden encontrarse como bacilos aislados, en pares o formando cadenas cortas, móviles por un flagelo polar. Anaerobios facultativos. En

cultivos de 2 a 4 horas puede presentar flagelos laterales. La flagelación lofótrica es excepcional. Nutrición quimioorganotrófica. Produce oxidasa y catalasa. Fermenta la glucosa con producción de ácido y gas. Reduce el nitrato a nitritos. Producen gran número de exoenzimas como; amilasa, DNAsa, lipasa, fosfatasa, aerolisina, enterotoxinas, fosfolipasas, aciltransferasas, quitinasa y proteasas. La temperatura de crecimiento oscila entre 10-41 °C. Algunas cepas de *Aeromonas hydrophila* son bioquímicamente más activas a 22 °C que a 37 °C. Crecen en caldo nutritivo con NaCl de 3.5% a 6.5%. Sobre el agar sangre la mayoría de las cepas muestra una amplia zona de β hemólisis. Pocas cepas fermentan la lactosa. El contenido de Guanina y Citosina de su ADN es de 57 a 63 mol % (Austin, B. *et al.*, 1996).

Distribución geográfica y epidemiología

Aeromonas hydrophila tiene una distribución cosmopolita. Puede encontrarse en aguas residuales, en aguas dulces y saladas con valores de pH de 5.2 a 9.8 y temperaturas de 4 a 45° C. Se ha aislado también de suelo y alimentos e infecta principalmente a peces, anfibios, reptiles y mamíferos como el hombre (Graevenitz, A. V., 1990).

Las infecciones por *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, y *A. caviae* en humanos ocurren principalmente entre los meses de Mayo a Noviembre, probablemente debido al contacto con agua no tratada. (Burke, V., *et al.* 1983). Se han descrito 4 categorías de infecciones: 1) Celulitis o infección de heridas por exposición a agua o suelo; 2) Diarrea aguda de corta duración, algunas veces sanguinolenta y coleriforme que ataca a cualquier grupo de edad pero que prevalece principalmente en pacientes que presentan diarrea del viajero y en menores de 5 años; 3) Septicemia asociada a enfermedades hepatobiliares, pancreáticas o malignas, en particular leucemia aguda; 4) Otras infecciones, por ejemplo; infecciones postoperatorias, casos raros de infecciones del tracto urinario, meningitis, peritonitis, endocarditis y otitis (Burke, V., *et al.* 1983).

Se ha reportado que los humanos y animales pueden ser portadores del germen. (Burke, V., *et al.*, 1983.). En Australia las tasas de portadores por *Aeromonas hydrophila* son de 2 a 3% (Burke, V., *et al.*, 1983). Un estudio reciente realizado en Tailandia mostró tasas de portador de 8 a 16% en niños y 27 % en adultos (Pitarangsi, Ch., *et al.* 1982.)

Resistencia bacteriana a antibióticos

La resistencia bacteriana a los antibióticos fue reportada por primera vez por Morgenroth y Kaufman (1912). Posterior a la introducción de varios antibióticos se reportaron cepas bacterianas resistentes a sulfanilamida (Maclean, *et al.*, 1939), a penicilina (Abraham *et al.*, 1941), y a estreptomycin (Murray, *et al.*, 1964).

Se ha demostrado que la selección de bacterias resistentes a los antibióticos esta relacionada con el uso de estos agentes, tanto para uso humano como veterinario y agrícola (Kuperstoch-Portnoy, 1981). Por ejemplo, en un estudio de 697 cepas clínicas de *Salmonella* y 195 de *Shigella* realizado en México (Kuperstoch-Portnoy, 1981), se encontró que 20.5% de las primeras fue resistente a ocho o más antibióticos, en tanto que el 17% de las segundas fue resistente a cuatro o más antibióticos.

Por otra parte en cepas de *Aeromonas sp.* se ha descrito que son resistentes a los principales grupos de antibióticos β -lactámicos como; penicilina, ampicilina, cefalosporinas, así como también a la eritromicina (Kokka, R.1992). Un claro ejemplo de esto lo demuestra el aislamiento de cepas de *Aeromonas hydrophila* de un grupo de niños nativos, en donde el porcentaje de resistencia para ampicilina, ticarcilina, y cefalotina fue del 10 % (Kokka, R.1992).

Walsh *et al.*, reportaron la capacidad de *Aeromonas sp.* para producir mutantes resistentes a antibióticos (Walsh, T. R. *et al.* 1991).

En un estudio realizado en la Taiwan, se aisló 234 cepas de *Aeromonas sp.* obtenidas de muestras sanguíneas. En este trabajo las cepas fueron resistentes a antibióticos como trimetoprim con sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina (Ko W. C. *et al.*, 1996).

En otro estudio realizado sobre 43 cepas de *Aeromonas sp.* aisladas de diferentes muestras clínicas de pacientes infectados se encontró que el 94% fue resistente a ampicilina, 60% a cotrimoxazol y 40% a cloranfenicol (Ahmed, A. *et al.*, 1998).

En la universidad de Chile en el año de 1998 se realizó un estudio sobre 172 cepas de *Aeromonas sp.* aisladas de muestras de agua y se encontró que las cepas fueron resistentes a carbencilina, estreptomycin y al metal pesado cadmio (Miranda, C. 1998)..

En mayo de 1988 se aislaron 225 cepas de *Aeromonas sp.* de 219 pacientes: 178 (79.1%) fueron aisladas de heces, 19 (8.4 %) de heridas, 11 (4.9%) de sangre y 17 (7.6%) de otros sitios. Basándose en los datos anteriores se concluyó que la tasa de incidencia de *Aeromonas sp.* en California en ese año fue de 0.7 por millón de la población. (Graevenitz, A. V., 1990).

Mecanismos de resistencia a los antibióticos.

El mal uso de los medicamentos y la automedicación, ha seleccionado bacterias multirresistentes las cuales constituyen un grave problema que se agudiza en los hospitales. Es común que estas cepas resistentes posean plásmidos que les confieren dicho fenotipo (Bryan, L. E. 1980).

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos mediados por plásmidos se han agrupado en cuatro categorías (Tabla 1) (Amábile, C. C., 1988).

Destoxificación enzimática.

Disminución de la entrada o retención en la célula.

Modificación del blanco.

Síntesis de vía alterna al fármaco.

Tabla 1. Mecanismos de acción de los antibióticos y de resistencia de las bacterias.

MECANISMOS DE RESISTENCIA	MECANISMOS DE ACCIÓN	ANTIBIÓTICO.
Destoxificación enzimática	Inhibición de la síntesis de la pared celular	β-Lactámicos. - Penicilina - Cefalosporina
Destoxificación enzimática	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Aminoglucósidos Gentamicina. Estreptomina. Neomicina.
Destoxificación enzimática	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Cloranfenicol.
Disminución en la entrada o retención en la célula.	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Tetraciclinas.
Modificación del blanco	Inhibición de la síntesis de proteínas.	Macrólidos y relacionados. Eritromicina. Lincodamidas.
Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco.	Inhibición de la síntesis de ácido fólico.	Sulfonamidas trimetoprim.

Tomado de Amábile Cuevas, C.F. 1988.

Resistencia a antibióticos y metales pesados

Como ya mencionamos, el empleo de los antibióticos puede seleccionar bacterias resistentes a estos agentes (Kuperstoch-Portnoy, 1981), siendo frecuente que esta resistencia se encuentre conferida por plásmidos (Watanabe, 1963).

De igual manera que se han reportado bacterias resistentes a los antibióticos, se han descrito bacterias resistentes a uno o más metales pesados (Nakahara, *et al.*, 1977^a; Silver, 1988).

La resistencia a metales pesados en varios de los casos puede ser conferida por plásmidos o por transposones (Silver, 1981).

El empleo de los antimicrobianos en los hospitales puede seleccionar bacterias resistentes tanto a antibióticos como a metales pesados, toda vez, que ambos determinantes de resistencia pueden encontrarse asociados en el mismo plásmido y la selección de resistencia a un antibiótico conduciría, de manera indirecta, a seleccionar resistentes al metal (Silver, *et al.*, 1988). Por ejemplo, en el año de 1970 se aislaron cepas clínicas de *E. coli* resistentes a antibióticos y metales pesados, en las que ambas resistencias se encontraban conferidas por el mismo plásmido (Nakahara, *et al.*, 1992).

Se han reportado numerosos ejemplos de resistencia a antibióticos y metales pesados mediados por el mismo plásmido. En la tabla 2 se presenta un resumen de los ejemplos de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Staphylococcus aureus*, así como en otras especies bacterianas.

Tabla 2. Ejemplos de resistencia a antibióticos y metales pesados conferidos por el mismo plásmido.

BACTERIA	ANTIBIÓTICO	METAL	REFERENCIA
<i>S. aureus</i>	Penicilina	Mercurio	Moore, 1960
	Penicilina Macrólidos	Arsénico Bismuto Cadmio Zinc Mercurio	Novick, <i>et al.</i> , 1968
	Penicilina SXT Estreptomicina Kanamicina	Mercurio Cadmio Arsénico	Nakahara, <i>et al.</i> , 1977 ^a
	Macrólidos	Cadmio	Nakahima, 1990
<i>P. aeruginosa</i>	Estreptomicina Tetraciclina Kanamicina Gentamicina	Mercurio Cadmio Arsénico	Nakahara, <i>et al.</i> , 1977 ^b
<i>E. coli</i>	Estreptomicina Tetraciclina Cloranfenicol Kanamicina Gentamicina	Cadmio Arsénico Mercurio	Nakahara, <i>et al.</i> , 1992

Interacción de las bacterias con los metales

Las bacterias poseen la capacidad de interactuar con los iones de los elementos de la tabla periódica. Estos iones pueden dividirse en tres grupos (Silver, 1983; Cervantes, 1994) (tabla 3).

Tabla 3. Relación de los iones con las bacterias

Clasificación de los iones que interactúan con las bacterias
1.- Iones esenciales: Mg ²⁺ , K ⁺ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺
2.- Iones abundantes pero comúnmente no esenciales: Na ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻
3.- Iones no esenciales y tóxicos: Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Ag ⁺ , Pb ²⁺ , BiO ⁺ , SbO ⁺ AsO ₂ ⁻ , AsO ₄ ³⁻ , CrO ₄ ²⁻ , Cr ₂ O ₇ ²⁻ , TeO ₃ ²⁻

(Silver, 1983; Cervantes, 1994)

En el tercer grupo se encuentran algunos de los metales pesados (por su alta densidad) más tóxicos, cuya toxicidad se basa principalmente en su interacción con las macromoléculas bacterianas. Por ejemplo, los iones mercurio, plata, cobre, zinc y arsenito interactúan con los grupos sulfhidrido de las proteínas, alterando su estructura y funciones; de esta forma algunos metales inhiben la actividad catalítica de ciertas enzimas, la transferencia de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

electrones por proteínas de la cadena respiratoria o el funcionamiento de los componentes de la membrana celular (Silver, 1983; Cervantes, *et al.*, 1986; Cheg, *et al.*, 1986).

Se ha reportado que ciertos iones como el cromo trivalente, cadmio y cobre tienen un efecto mutagénico sobre las bacterias al interactuar éstos sobre la cadena de ADN, mientras que otros como el arseniato, cromato y cadmio compiten con los iones esenciales para su transporte al interior de la célula (Silver, 1983; Ohtake, *et al.*, 1987).

Mecanismos de resistencia a metales pesados

Los determinantes de resistencia a metales pesados se encuentran a menudo localizados en plásmidos o en transposones (Silver, 1981; Silver, *et al.*, 1984; Summers, 1978).

La localización de los determinantes de resistencia a metales pesados en los últimos años ha facilitado la clonación de varios de ellos y en algunos casos se ha determinado su secuencia de nucleótidos y deducido la de los aminoácidos correspondientes (Silver, & Walderhaugh, 1992; Cervantes, & Gutiérrez-Corona 1994).

Arsénico

Se ha reportado que la resistencia a arsénico mediada por plásmidos incluye a los iones arseniato, arsenito y antimonio. En *Staphylococcus aureus* y en *Escherichia coli* se han descrito un grupo de genes asociados en un operón denominado *ars* cuyo funcionamiento puede ser inducido por cualquiera de los iones mencionados (Silver, *et al.*, 1981 y 1988).

El operón *ars* (del plásmido R773) fue clonado y secuenciado por (Chen *et al.*, 1986), quienes identificaron tres genes y dedujeron la secuencia de las tres proteínas correspondientes. Ars A es una proteína asociada con la membrana celular y tiene características de una ATPasa (Rosen, *et al.*, 1988). ArsB es también una proteína de membrana, funciona como canal iónico y es responsable de la expulsión de los iones de arsénico. La tercera proteína ArsC es una proteína necesaria para la resistencia a arseniato pero no a arsenito o antimonio (Chen, *et al.*, 1986). ArsC es probablemente una subunidad reguladora de ArsB, que modifica la especificidad por los diferentes iones. Recientemente se ha descrito un gene más, *arsR*, el cual funciona como regulador del operón (San Francisco, *et al.*, 1990).

En resumen, los iones tóxicos son captados inicialmente por los sistemas fisiológicos de transporte de la célula (figura 1); una vez en el citoplasma, estos iones inducen la expresión de la ATPasa (ArsA), la cual

genera energía para expulsarlos de la célula a través del canal iónico de la membrana ArsB.

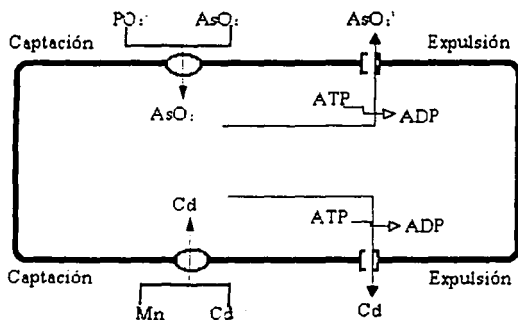


Figura 1. Mecanismo de captación de los iones tóxicos arseniato (AsO_4^{3-}) y cadmio (Cd^{2+}) por la vías fisiológicas de transporte de fosfato (PO_4^{3-}) y manganeso (Mn^{2+}), respectivamente.

Cadmio

La resistencia a cadmio constituye uno de los marcadores genéticos de resistencia más comunes en los plásmidos de los estafilococos (Smith, K. & R.P. Novick 1972). En *Staphylococcus aureus* el cadmio penetra a la célula por la vía del transporte del ión manganeso (Perry, R.D. *et al.*, 1982) (figura 1).

El mecanismo de resistencia a cadmio se ha estudiado con mayor detalle en *Staphylococcus aureus*. Los plásmidos contienen dos genes que confieren distintos niveles de resistencia tanto a cadmio como a zinc, *cadA* (nivel elevado) y *cadB* (nivel reducido) (Novick, R. P. *et al.*, 1979; Walter, E. G. *et al.*, 1989). Tynecka y col. (1981) encontraron que las células de *S. aureus* que poseen *cadA* muestran una incorporación reducida de cadmio debido a un mecanismo de flujo que elimina el cadmio intracelular.

En los últimos años el gene *cadA* del plásmido p1258 de *S. aureus* fue clonado y secuenciado (Nucifora, G. *et al.*, 1989). El análisis de la secuencia mostró que *cadA* codifica para una proteína con homología significativa con las ATPasas del tipo E1E2 que funcionan en la translocación de cationes citoplásmicos (Nucifora, G. *et al.*, 1989). Las ATPasas E1E2 incluyen a la ATPasa de potasio de bacterias Gram positivas y Gram negativas, la ATPasa que interviene en el flujo de protones para la generación de potencial de membrana en eucariontes inferiores y las ATPasas de calcio del retículo sarcoplásmico (Silver, S. *et al.*, 1988).

De esta manera el mecanismo de resistencia a cadmio en *S. aureus* funciona mediante el flujo del cadmio intracelular que es energizado por una ATPasa (figura 1) (Nucifora, G. *et al.*, 1989).

Cobalto Niquel y Zinc

Las concentraciones elevadas de estos cationes ejercen efectos tóxicos sobre los microorganismos (Cervantes, 1990).

Se ha reportado que la cepa de *Alcaligenes eutrophus* CH34 contiene dos plásmidos; pMOL28, que determina la resistencia a níquel y bajos niveles de cobalto (cobA) y pMOL30 con resistencia a zinc, cadmio y altos niveles de cobalto (cobB) (Mergeay, *et al.*, 1985).

Se ha demostrado que la resistencia es inducible y que las células resistentes inducidas en presencia de estos metales expulsan del citoplasma cualquiera de los cationes por un mecanismo aún desconocido (Nies, & Silver, 1990).

Cobre

El cobre se considera un micronutriente esencial para el crecimiento bacteriano, pero en concentraciones elevadas es sumamente tóxico. Los determinantes de resistencia a cobre han sido clonados a partir de plásmidos de *P. syringae* (Bender, & Cooksey, 1987) y *E. coli* (Rouch, *et al.*, 1989). El mecanismo de resistencia en *P. syringae* se basa en la excreción de proteínas que capturan al cobre impidiendo su efecto tóxico (Mellano, & Cooksey,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988). Estas proteínas tienen un octapéptido que se encuentra repetido varias veces y que se postula es la región que captura al cobre.

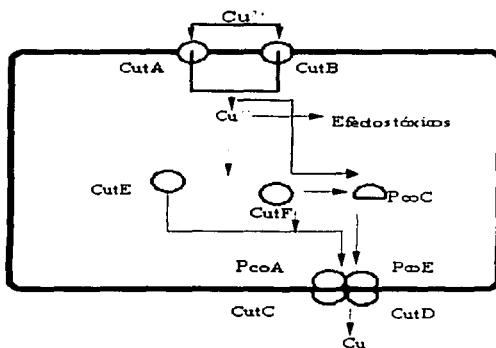


Figura 2. Cooperación de los productos génicos cromosómicos (Cut) y plasmídicos (Pco) en el mecanismo de resistencia a cobre en *Escherichia coli*.

Se ha demostrado la expulsión del cobre intracelular en cepas de *E. coli* resistentes, y se ha postulado un modelo de captación, quelación y finalmente de expulsión del ión (Rouch, *et al.*, 1989) (fig. 2). Probablemente en los tres procesos intervienen productos génicos codificados tanto por plásmidos como por el cromosoma (Cervantes, 1988)

Se han descrito otras estrategias por parte de las bacterias para resistir a los efectos tóxicos del cobre como: precipitación mediada por plásmidos

(Erardi, *et al.*, 1987) y excreción de ácidos orgánicos u otros agentes quelantes (Harwood-Sears, & Gordon, 1990).

Cromo

Los estados de oxidación del cromo juegan un papel importante en los efectos tóxicos; mientras en la forma trivalente se considera un micronutriente esencial, el cromo hexavalente (cromatos y dicromatos) es altamente tóxico (Cervantes, *et al.*, 1990)

Se ha descrito que la resistencia a cromato determinada por plásmidos se basa en la acumulación disminuida del ión por las células resistentes (Ohtake, & Silver 1987; Cervantes, & Ohtake, 1988). Recientemente se han secuenciado dos determinantes de resistencia a cromato a partir de plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes, *et al.*, 1990) y *A. eutrophus* (Nies, & Silver, 1990). El análisis de estas secuencias reveló una homología entre los polipéptidos hidrofóbicos, designados ChrA, codificados por ambos determinantes. Se asume que ChrA es una proteína de membrana responsable de la traslocación de los iones de cromato, de manera similar al papel de ArsA en la expulsión de arseniato (Cervantes, *et al.*, 1990) (figura 1).

Se ha reportado un mecanismo de resistencia a cromo no codificado por plásmidos que se basa en la destoxificación del cromo hexavalente mediante su reducción a cromo trivalente (Erardi, 1987) (figura 3).

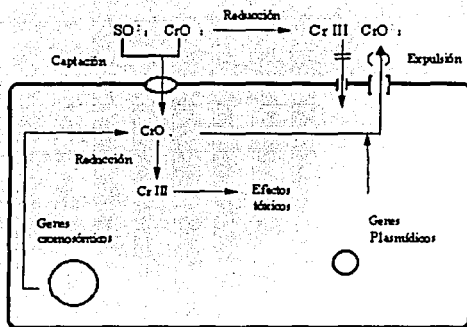


Figura 3. El cromo hexavalente penetra a las bacterias por el sistema de transporte del sulfato y puede ser reducido a cromo trivalente en el citoplasma o en el exterior de las células (genes cromosómicos). Las bacterias resistentes expulsan el cromo hexavalente mediante productos génicos codificados por plásmidos.

Mercurio

Se ha descrito que la resistencia a mercurio se debe a una reducción de la forma inorgánica (Hg^{2+}) a la forma metálica volátil (Hg^0), constituyendo, de esta manera, una eficiente forma de detoxificación (Summers, & Silver 1978) (figura 4). Los determinantes plasmídicos de resistencia a mercurio de bacterias Gram negativas provenientes de 3 diferentes fuentes fueron clonados y secuenciados: los transposones Tn21 de *Shigella flexneri* y Tn501 de *Pseudomonas aeruginosa* (Brown, *et al.*, 1986; Misra, *et al.*, 1984) y el plásmido pDU1358 de *Serratia marcescens* (Griffin, *et al.*, 1987). Estos

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

autores encontraron gran homología entre las proteínas deducidas de la secuencia del DNA de las 3 especies. La resistencia a mercurio se encuentra asociada al operón *mer*, el cual consta, de un gene regulador que codifica para la proteína MerR y a continuación se encuentra la región del operador-promotor a donde se une MerR y el primer gene estructural que codifica una proteína membranal, MerT, que transporta el mercurio extracelular. El siguiente gene *merP*, origina una proteína periplásmica con capacidad de unión de mercurio, que se postula como responsable de acarrear el catión unido a MerT al citoplasma. Después se haya *merC*, cuyo papel en el transporte de mercurio no ha sido definido (Kusano, *et al.*, 1990). Finalmente, el gene *merA*, que contiene FAD como cofactor y cuya forma funcional es dimérica. Los 3 polipéptidos MerT, MerP y MerA tienen en común la presencia de pares de cisteínas que se cree están involucrados en la unión del mercurio y en su transporte secuencial del exterior al espacio periplásmico y al citoplasma para su detoxificación (Silver, & Misra. 1988).

Se ha encontrado un gene adicional en el determinante de *Serratia*, *merB*, que codifica una liasa, enzima que amplía el espectro de resistencia a compuestos organomercuriales (Griffin, *et al.*, 1987) (tales como los antisépticos merthiolate y mercurocromo). La liasa rompe el enlace entre el carbono y el mercurio del organomercurial liberando el mercurio iónico que es

posteriormente destoxificado por la reductasa (Silver, & Misra. 1988) (figura 4).

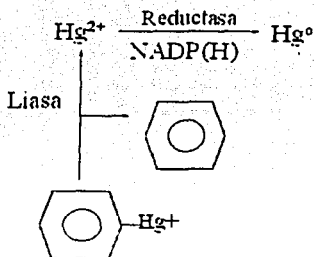


Figura 4. Destoxificación de mercurio y organomercuriales. La reductasa plasmídica transforma el ión mercúrico en la forma volátil menos tóxica (Hg^0). Algunos también codifican una liasa que actúa sobre los organometales. (Silver, & Misra. 1988)

Plata

El amplio uso de los derivados de plata en la industria y hospitales (como antimicrobianos en pacientes con quemaduras) ha seleccionado bacterias resistentes a éste metal. Se ha reportado que tanto las bacterias sensibles como las resistentes son capaces de reducir la plata iónica (Ag^+) a la forma metálica, por lo que la reducción se ha eliminado como el mecanismo de resistencia. (Siver, 1996). Recientemente se ha descrito que el mecanismo de resistencia a plata se basa en el flujo intracelular del ión hacia el exterior probablemente codificado por genes del cromosoma bacteriano (Xian-Zhi, 1997).

TESIS CON
 FALLA DE OR.GEN

No obstante que ya han sido esclarecidos los mecanismos de resistencia a algunos metales por parte de las bacterias, a la fecha, no se conoce mecanismo de resistencia alguno a plomo, ni siquiera ha quedado claro si existen bacterias resistentes a este metal. Sólo hay un reporte de (Nakahara, y col. 1977^b) en donde la distribución de la CMI (concentración mínima inhibitoria) de plomo en una población de cepas clínicas de *S. aureus* fue bimodal, distinguiéndose así, dos subpoblaciones (sensible, CMI = 3.1-6.2 µg/ml y resistente CMI = 1600-3200 µg/ml).

Debido a lo anterior es muy importante determinar la resistencia a antibióticos y a metales pesados en cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum* con el propósito de encontrar cepas resistentes a plomo, o como un sondeo para evaluar la contaminación del embalse de San Felipe de Tiacaque por metales pesados.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la resistencia a antibióticos y metales pesados en un grupo de cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*

PARTICULARES

- Establecer la resistencia a 12 antimicrobianos por el método de Bauer-Kirby
- Cuantificar la resistencia a plomo, cromato, zinc, plata, mercurio y arsénico por el método de dilución en placa.

MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 20 cepas de *Aeromonas hydrophila* las cuales fueron aisladas del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*.

Resistencia a antibióticos

Una vez identificadas las bacterias se utilizo la técnica de Bauer-Kirby (Bauer, *et al.*, 1966) para probar la sensibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias (de cada cepa) con un asa estéril y se inocularon en 5 ml de caldo Mueller Hinton, se incubaron a 37° C hasta que se obtuvo una turbidez ligera (3 horas), la turbidez se ajustó con solución salina estéril hasta que se obtuvo una densidad comparable, con un estándar de sulfato de bario. El estándar se preparo mezclando 5 ml de BaCl₂ 0.048 M (1.175% peso/volumen de BaCl₂ 2H₂O) con 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36N), que fue la mitad de la densidad del estándar No. 1 de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland), el estándar correspondió a 10⁸ microorganismos/ml. Posteriormente se procedió a inocular sobre el agar de Mueller-Hinton por medio de hisopos estériles, los cuales se humedecieron con la suspensión (crecimiento bacteriano) y se estriaron sobre la totalidad de la superficie del agar. Por último se tomo un sensidisco con los 12 antimicrobianos a determinar (Sanofi diagnostics, Pasteur), con una pinza

estéril y se colocó sobre el agar de Mueller-Hinton. Así el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o permitió el crecimiento de las bacterias en un tiempo de 24 h a 37° C. De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo el diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte (tabla 4).

Tabla 4. ANTIBIOTICOS QUE SE UTILIZARON CONTRA LAS CEPAS DE *A. hydrophila*.

ANTIBIOTICOS	ABREVIATURA	FAMILIA	ACCIÓN ^a	DIAM. HALO DE INH. (mm) ^b		
				R	I	S
Amikacina	AK	Aminoglucósido	1	≤ 14		≥ 17
Ampicilina	AM	Aminopenicilina	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Carbencilina	CB	Penicilina	1	≤ 21		≥ 30
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1 ^a generación	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefuroxima	CTX	Cefalosporina de 2 ^a generación	1	≤ 14		≥ 23
Ceftriaxona	CRO	Cefalosporina de 3 ^a generación	1	≤ 13	14-20	≥ 21
Cloranfenicol	CL		3	≤ 12	13-17	≥ 18
Gentamicina	GE	Aminoglucósido	3	≤ 12	13-14	≥ 15
Netilmicina	NET	Aminoglucósido	3	≤ 12	13-14	≥ 15
Nitrofurantoina	NF	Nitrofuranos	4	≤ 14	15-16	≥ 17
Pefloxacina	PEF	Quinolonas	3	≤ 14	15-22	≥ 23
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT		4	≤ 10	11-15	≥ 16

^a 1 Inhibición de la formación de la pared celular. 3 Interferencia en la síntesis de proteínas.

^b 4 Inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos

^b R = Resistente, I = Intermedia y S = Sensible

Tomada de Giono, C.S. 1983.

Determinación de la CMI a metales pesados

La determinación de la CMI a los metales pesados se realizó por el método de dilución en placa en agar nutritivo (Cervantes-Vega. *et al.*, 1986), cada cepa se creció en caldo nutritivo (agitación por 16 horas a 37 °C). Posteriormente cada cultivo se diluyó (1:3) en los pozos del replicador, para después realizar las replicas en las cajas de agar nutritivo más diluciones dobles seriadas de la sal de cada metal (tabla 5). Los metales en forma de sales que se utilizaron fueron: acetato de plomo (Pb (CH₃COO)₂), cromato de potasio (K₂CrO₄). Cloruro de Zinc (ZnCl₂), acetato de plata (C₂H₃O₂Ag), cloruro de mercurio (HgCl₂) y arsenito de sodio (NaAsO₂).

Tabla 5. Concentraciones de los metales utilizados

PLOMO	AGAR	stock A	stock B	stock C
µg/ml	µg/50 ml	80 mg/ml	(A= 1/10)	(B = 1/100)
1200	160000	2 ml		
1600	80000	1 ml		
800	40000	0.5000 ml		
400	20000	0.2500 ml		
200	10000	0.1250 ml		
100	5000		0.06250 ml	
50	2500		0.03125 ml	
25	1250		0.01562 ml	
12.5000	625			0.007812 ml
6.2500	312.5000			0.003906 ml
3.1250	156.2500			0.001953 ml
1.5625	78.2500			0.000977 ml
		stock A		
PLATA		1.25 mg/ml		
30	1500	1.2 ml		
25	1250	1.0 ml		
20	1000	0.8 ml		
15	750	0.6 ml		
10	500	0.4 ml		
5	250	0.2 ml		
2.5	125	0.1 ml		
1.25	62.5	0.05		
0.625	31.25	0.025		
0.3125	15.625	0.012		
0.15625	7.8125	0.006		

		stock A	Stock B
ARSENITO		80 mg/ml	(A= 1/10)
3200	160000	2 ml	
1600	80000	1 ml	
800	40000	0 5000 ml	
400	20000	0 2500 ml	
200	10000	0 1250 ml	
100	5000		0 06250 ml
50	2500		0 03125 ml
25	1250		0 01562 ml
		Stock A	
ZINC		34 mg/ml	
680	68000	2 ml	
340	34000	1 ml	
170	17000	0 500	
85	85000	0 250	
42 5	42500	0 125	
21 25	21250	0 062	
10 62	10620	0 031	
5 31	5310	0 015	
		Stock A	
CROMATO		5 mg/ml	
3000	150000	2 ml	
1500	75000	1 ml	
750	37500	0 5000 ml	
376	18750	0 2500 ml	
187 5000	9375	0 1250 ml	
93 5000	4687 5000	0 0625 ml	
MERCURIO		stock A	stock B
µg/ml	µg/50ml	5 mg/ml	(A=1/10)
320	16000	2 ml	
160	8000	1 ml	
80	4000	0 5000 ml	
40	2000	0 2500 ml	
20	1000	0 1250 ml	
10	500		0 06250 ml
5	250		0 03125 ml
2 5000	125		0 01562 ml
1 2500	62 5000		0 00781 ml

Stock " A " = mg de cada metal más 10 ml de agua destilada estéril.

Stock " B " = 1 ml del Stock "A" más 9 ml de agua destilada estéril.

Stock " C " = 1 ml del Stock "B" más 9 ml de agua destilada estéril.

Clasificación de la resistencia a metales pesados.

Las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) con base a los criterios reportados por (Nakahara, et al., 1977^a), para cepas de *S.aureus* método de dilución en placa tabla 6.

Tabla 6. Intervalos de clasificación para las cepas de *Staphylococcus aureus* como sensibles (S) o resistentes (R) a metales pesados.

METAL	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	S	R
Plomo	3.1-6.2	800-3200
Cromato	1-750	751-3000
Mercurio	1.6-6.2	12.5-50
Zinc	5.31-170	171-680
Plata	0-10	20-50
Arsenito	25-200	1600-3200

Nakahara, 1977*; Xian-zhi, 1997.

RESULTADOS.**Resistencia a antibióticos por *Aeromonas hydrophila*.**

El 100% de las cepas fue resistente a ampicilina (AM), 95% a carbenicilina (CB), y 40% a cefalotina (CF). Mientras que el 100% de las cepas resultaron sensibles a cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO), netilmicina (NET), pefloxacina (PEF), nitrofurantoina (NF), cloranfenicol (CL), amikacina (AK), trimetoprim con sulfametoxazol (SXT), así como a gentamicina (GE). (Figura 5)

Resistencia a metales pesados por *Aeromonas hydrophila*.**Plomo**

En la figura 6 se observa que la distribución de la CMI de plomo para las cepas de *Aeromonas hydrophila* se distribuyó en el pico de resistencia de 800 a 3200 $\mu\text{g/ml}$.

Cromato

En la figura 7 se observa que el 100% de las cepas fue sensible a cromato, situándose el pico en el intervalo de 93.5-187 $\mu\text{g/ml}$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 5
RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*.

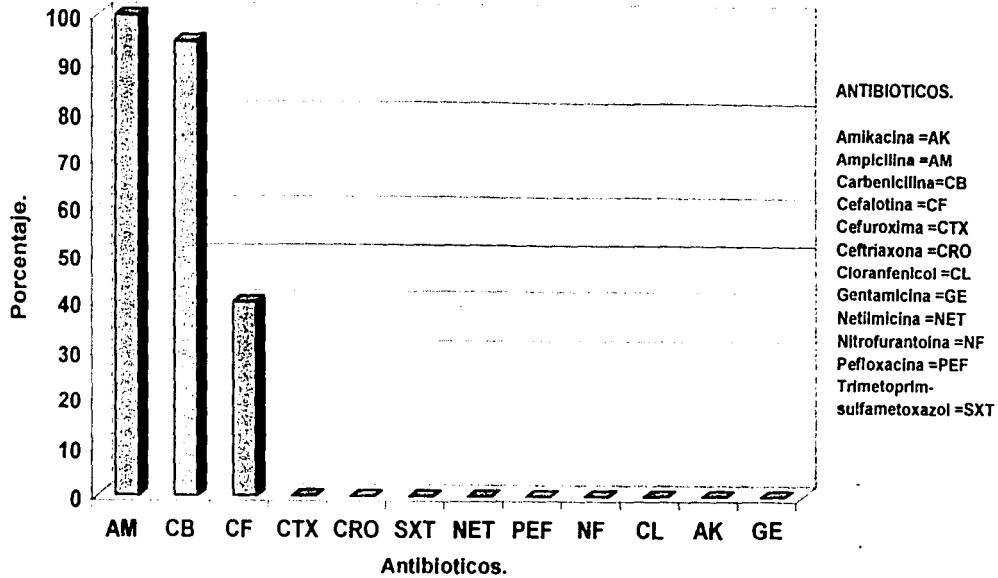


FIGURA 6
SUSCEPTIBILIDAD A PLOMO EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*.

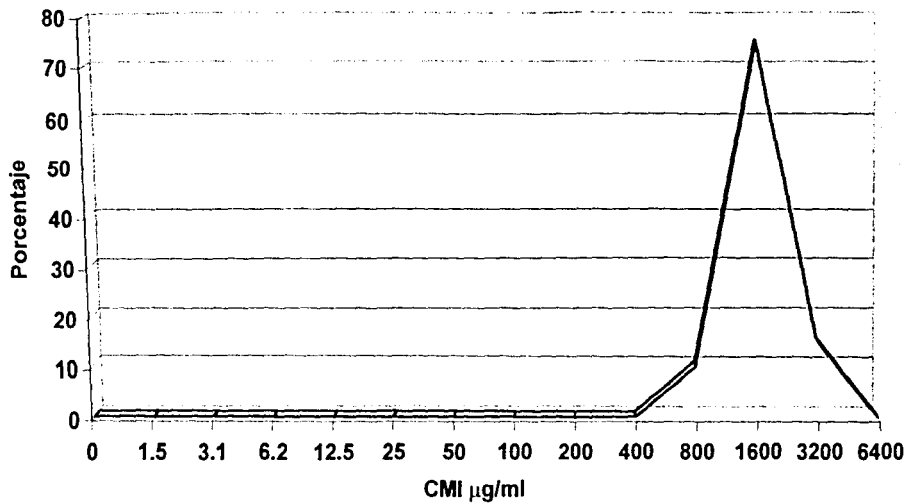
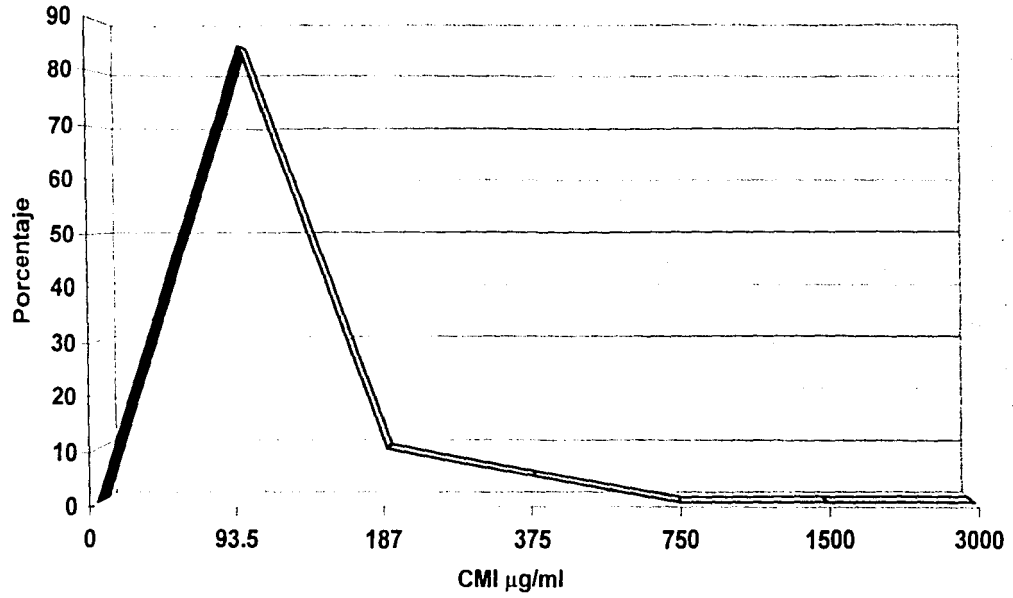


FIGURA 7
SUSCEPTIBILIDAD A CROMATO EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*.



Mercurio.

El 100% de las cepas presentó resistencia frente al mercurio en el intervalo de 10-40 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 8).

Arsenito.

En la figura 9 se observa que la distribución de la CMI para arsenito fue bimodal, sensible (90% de las cepas) en el intervalo de 100 a 400 $\mu\text{g/ml}$ y resistente o moderadamente resistente (10%) en el intervalo de 400 a 1600 $\mu\text{g/ml}$.

Plata.

El 100% de las cepas fue sensible a plata en el intervalo de 0.625-2.5 $\mu\text{g/ml}$ (figura 10).

Zinc

En la figura 11 se observa que el 100% de las cepas fue sensible a zinc en el intervalo de 21.25-42.5 $\mu\text{g/ml}$

FIGURA 8
SUSCEPTIBILIDAD A MERCURIO EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*

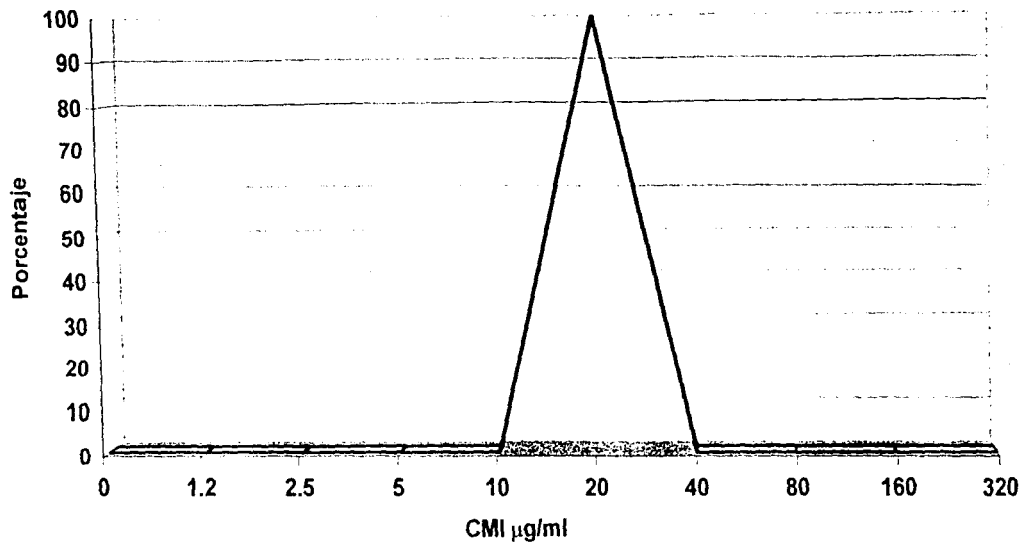


FIGURA 9
SUSCEPTIBILIDAD A ARSENITO EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*

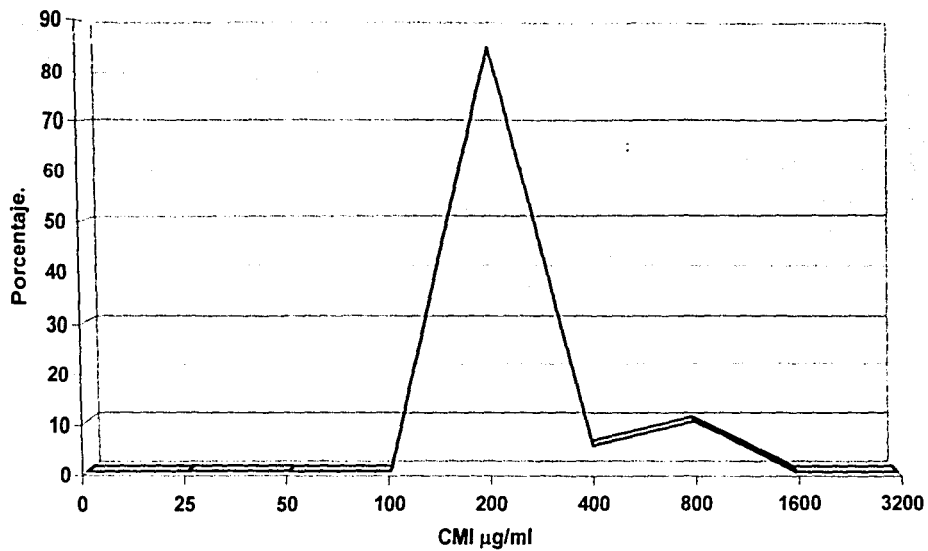


FIGURA 10
SUSCEPTIBILIDAD A PLATA EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*.

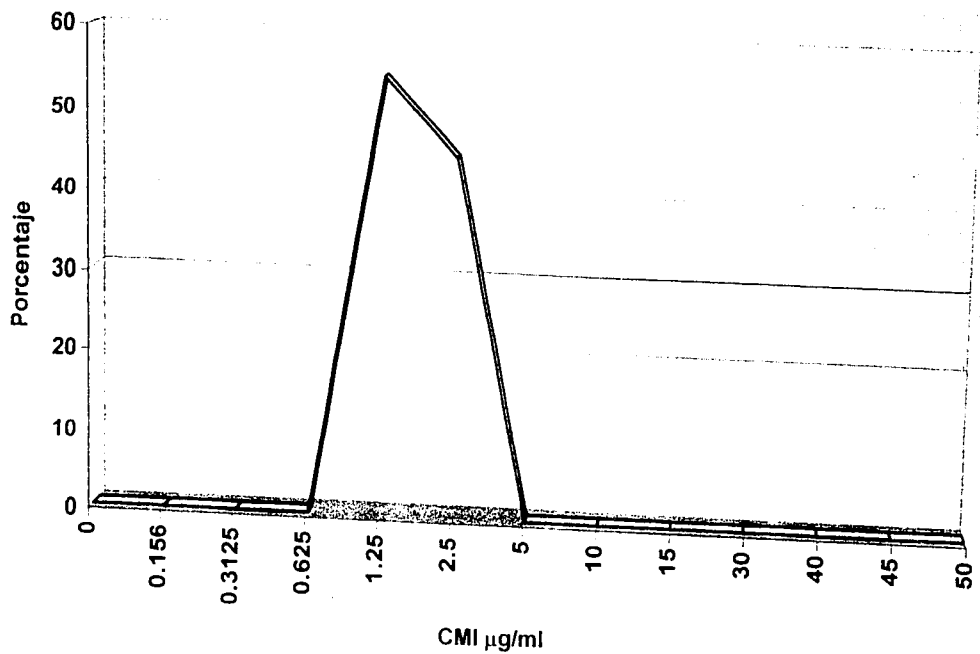
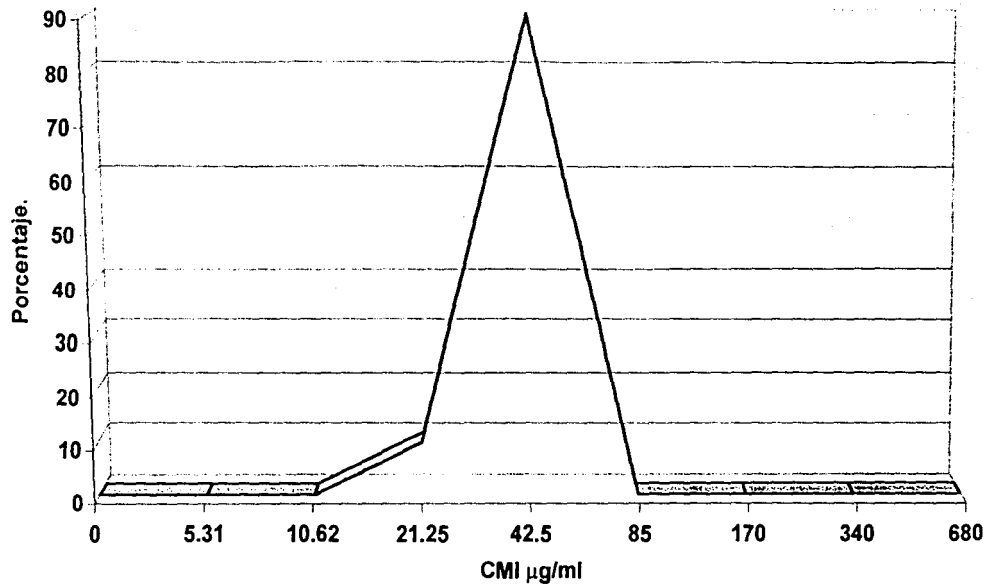


FIGURA 11
SUSCEPTIBILIDAD A ZINC EN CEPAS DE *Aeromonas hydrophila*.



DISCUSIÓN.

Resistencia a antibióticos.

El 100% de las cepas de *Aeromonas hydrophila* estudiadas en este trabajo fue resistente a ampicilina (AM), el 95% a carbenicilina (CB) y el 45% a cefalotina (CF) (figura 5). Nuestros porcentajes son semejantes a los reportados por Ko, *et al.*, (1996) en un estudio realizado sobre 234 cepas de *Aeromonas* (142 *A. hydrophila*, 59 *A. sobria*, 32 *A. caviae*, y 1 *A. Jandaei*) obtenidas de tejido sanguíneo de pacientes infectados que acudieron al Hospital General de la Universidad Nacional Taipei Chang Gung y al Hospital General Taipei para Veteranos en Taiwan. La susceptibilidad a 24 antimicrobianos se determinó por el método de dilución en placa. En dicho estudio se encontró que el 100 % de las cepas fue resistente a ampicilina y el 94% a cefalotina. Por otra parte nuestros porcentajes de sensibilidad frente a gentamicina, trimetoprim con sulfametoxazol y tetraciclina son similares a los descritos por estos autores (Ko, *et al.*, 1996). Con lo que respecta a las cefalosporinas de 3ª generación (Ceftriaxona y Cefuroxima) encontramos que el 100 % de las cepas analizadas se mostraron susceptibles (Figura 5). La discrepancia entre los porcentajes de resistencia (ampicilina y cefalotina) y de sensibilidad (ceftriaxona y cefuroxima) en nuestro trabajo probablemente se

deba a dos factores, el primero es que la ampicilina y cefalotina son utilizados con mayor frecuencia para el tratamiento de las infecciones por ser considerados como de "primera elección", ocasionando la selección de cepas bacterianas resistentes a estos antimicrobianos, y el segundo posiblemente es que la mayoría de las bacterias son productoras de β -lactamasas con afinidad para inactivar la ampicilina y cefalotina.

Resistencia a metales pesados.

En este trabajo reportamos que la distribución de la CMI a plomo por las cepas de *Aeromonas hydrophila* se mostró en el intervalo de resistencia de 1600-3200 $\mu\text{g/ml}$ (figura 6). Estos datos coinciden con los reportados por Vaca, *et al.* (1995) para 45 cepas Gram negativas (CMI = 800-3200 $\mu\text{g/ml}$) aisladas de una avenida contaminada por plomo de la Ciudad de México. Nakahara, *et al.* (1977^a) reportó que las cepas resistentes a plomo se encuentran en el intervalo de CMI = 800-3200 $\mu\text{g/ml}$, por lo que la distribución de la CMI de nuestras cepas coinciden con las de estos autores.

Los procesos que han sido considerados como responsables de la resistencia bacteriana al plomo es la precipitación como sulfuro de plomo o como plomo metilado (Summers & Silver 1988), sin embargo, el mecanismo de resistencia no ha sido aún descrito.

Respecto al cromo (figura 7) la CMI se distribuyó en el pico de sensibilidad de 93.5-187 $\mu\text{g/ml}$. Campos *et al.* (1995) trabajando con cepas aisladas de zonas contaminadas con cromo de las ciudades de México y León han reportado una distribución bimodal con picos menores de 750 $\mu\text{g/ml}$ para la población sensible y mayores para la resistente. Se ha reportado que la resistencia al cromo esta determinada por una alteración del transporte del sulfato dado que el cromo es incorporado por esta vía, así como también por una captación disminuida por parte de las células resistentes (Ohtake, 1987)

Todas las cepas analizadas por nosotros fueron resistentes al mercurio en el intervalo de 10-40 $\mu\text{g/ml}$ (figura 8). Se ha descrito para cepas de *S. aureus* una distribución bimodal, sensible en el rango de 1.6-6.25 $\mu\text{g/ml}$ y resistente entre 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$ (Nakahara, 1977^a).

En este trabajo reportamos que la CMI para arsenito fue bimodal, sensible (90% de las cepas) en el intervalo de 100 a 400 $\mu\text{g/ml}$ y resistente o moderadamente resistente (10%) en el intervalo de 400 a 1600 $\mu\text{g/ml}$ (figura 9). Es datos concuerdan con los reportados por Vaca, *et al.* (1995), para un grupo de cepas Gram negativas aisladas de suelos contaminados, en donde el pico de sensibilidad ocurrió entre 100-200 $\mu\text{g/ml}$ y el de resistente entre 1600-3200 $\mu\text{g/ml}$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El 100% de las cepas de *Aeromonas hydrophila* analizadas en este trabajo fue sensible a plata en el intervalo de 0.625-2.5 $\mu\text{g/ml}$. Se ha reportado que tanto las bacterias sensibles como las resistentes son capaces de reducir la plata iónica (Ag^+) a la forma metálica, por lo que la reducción se ha eliminado como el mecanismo de resistencia (Silver, 1996). Recientemente se ha descrito que el mecanismo de resistencia a plata se basa en el flujo intracelular del ión hacia el exterior probablemente codificado por genes del cromosoma bacteriano (Xian-Zhi, 1997).

En este trabajo se encontró que para el ion zinc el 100% de las cepas fue sensibles en el intervalo de 10 a 90 $\mu\text{g/ml}$. Se ha descrito que la resistencia a zinc se encuentra conferida en el plásmido pMOL30 de *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Mergeay, *et al.* 1985) y se ha demostrado que esta resistencia es inducible y que las células resistentes inducidas en presencia de zinc expulsan del citoplasma los cationes por un mecanismo aún desconocido (Nies, & Silver, 1990). Cabe mencionar que existen bacterias que utilizan el zinc para la producción de metalo β -lactamasas para la hidrólisis de carbenicilina en especies, tales como, *Aeromonas hydrophila*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, y *Pseudomonas aeruginosa* las cuales causan graves problemas clínicos reportado por Payne, D. J. (1993).

Un conocimiento más profundo de los diversos mecanismos básicos de resistencia a metales contribuirá al aprovechamiento práctico de los microorganismos y de sus interacciones con los iones metálicos.

CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas de *Aeromonas hydrophila* analizadas fue resistente a los antibióticos ampicilina considerado como “de primera elección”.
2. En este estudio se encontró que la totalidad de las cepas de *A hydrophila* estudiadas fue resistente a plomo y mercurio, lo que refleja probablemente la contaminación de estos metales en el ambiente.
3. Durante el desarrollo de este trabajo no se encontraron bacterias sensibles a plomo, por lo que es recomendable trabajar con un mayor número de cepas de *A hydrophila*, con el propósito de encontrar este grupo, y tratar de esclarecer si el mecanismo de la resistencia se encuentra codificada por plásmidos o por el cromosoma bacteriano.

REFERENCIAS.

1. Abraham, E. P., Chain, E., Fletcher, C. M., Florey, H. W., Gardener, A. D., Heatley, N. G., and Jennings, M. A., 1941 Further Observations on Penicillin. *Lancet* 2: 177-188.
2. Ahmed, A., Hafiz, S. Ahmed, Q. T., Majeed, H., Syed, S., 1998. Sensitivity pattern and beta-lactamase production in clinical isolates of *Aeromonas* strains. *JPMA J Pak Med. Assoc*, 48(6):158-61.
3. Amábile, C. C., (1988) La resistencia bacteriana a los antibioticos. *Ciencia y Desarrollo*. Núm. 80. CONACyT. Año XIV:57-68.
4. Austin, B., Altwegg M. A., Gosling, P. J. and Joseph S., 1996. The genus *Aeromonas*. WILEY, New York. E.U.A.
5. Bryan, L. E., (1980) Mechanisms of Plasmid mediated Drug Resistance. En: Stuttard, C., & K.R. Rozee., (eds.) " Plasmids and Transposons: Environmental effects Maintenance Mechanisms" Academic Press, New York pp. 57-81.
6. Bender, C.L. & D.A. Cooksey. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. *J. Bacteriol.* 169:470-474.
7. Brown, N.L.; T.K. Misra; J.N. Winnie; A. Schmidt; M. Seiff & S. Silver. 1986. The nucleotide sequence of the mercury resistance

- operons of plasmid R100 and transposon Tn501: further evidence for *mer* genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen Genet.* **201**:143-151.
8. Burke, V., Robinson, J., Berry, R. J., Peck, D., Beaman, J., & Bundell, C., (1983) The Microbiology of Childhood Gastroenteritis: *Aeromonas* species and other Infective Agents. *J. Infect. Dis.* **148**: 68-74.
9. Cervantes-Vega, C.; J. Chavez; N.A. Cordova; P. de la Mora & J. Velasco. 1986. Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* **48**:159-163.
10. Cervantes, C. & H. Ohtake. 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 173-176.
11. Cervantes, C.; H. Ohtake; L. Chu; T. K. Misra & S. Silver. 1990. Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid PUM505. *J. Bacteriol.* **172**: 287-291.
12. Cervantes, C. & Gutiérrez-Corona F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**:121-138

13. Chen, C.; T. K. Misra; S. Silver & B. P. Rosen. 1986. Nucleotide Sequence of the Structural Genes for an Anion Pump. The Plasmid-Encoded Arsenical Resistance Operon. *J. Biol. Chem.* **261**:15030-15038.
14. Erardi, F.X.; M.L. Failla & J.O. Falkinham III. 1987. Plasmid-encoded copper resistance and precipitation by *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1951-1954
15. Graeveniitz, A. V., (1990) *Aeromonas* and *Pleisomonas*. In Lennete, E.H., Balows, A., Hausler Jr. W.J., (1995) *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology: Washington, D.C. E.U.A. Pp. 179-194.
16. Griffin, H.G.; T.J. Foster; S. Silver & T.K. Misra. 1987. Cloning and DNA sequence of the mercuric and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:3112-3116.
17. Harwood-Sears, V. & A.S. Gordon. 1990. Copper-introduced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1327-1232.

18. Ko, W. C., K. W. Yu, C. Y. Liu, C. T. Huang, H. S. Leu, and Y. C. Chuang. 1996. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1260-1262.
19. Ko, W. C., Wu, H., Chang T., Yan, J., & Wu, J., (1988) Inducible β -Lactam Resistance in *Aeromonas hydrophila*: Therapeutic Challenge for Antimicrobial Therapy. *Journal of Clinical Microbiology.* 3188-3192.
20. Kokka, R.P., Vedros, N.A., & Janda. M., (1992) Immunchemical analysis and possible biological role of an *Aeromonas hydrophila* surface array protein in Septicaemia. *Journal of General Microbiology,* 138: 1229-1236.
21. Kuperstoch-Portnoy, 1981, Antibiotic Resistance of Gram negative bacteria in México: Relationship to drug consumption En: Levy, S. B., Clowes and E. L. Koenig (eds) *Molecular, Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids.* Plenum Press. New York. pp.529-537.
22. Kusano, T.; G. Ji; C. Inoue & S. Silver. 1990. Constitutive synthesis of a transport function encoded by the *Thiobacillus ferrooxidans* mer C gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:2688-2692.

23. MacClean, I. H., Rogers, K. B., and Fleming A., 1939 M. & B. 693 and Pneumococci. *Lancet*. **1**:562-568.
24. Mellano, M.A. & D.A. Cooksey. 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. *J. Bacteriol.* **170**:2879-2883.
25. Mergeay, M.; D. Nies; H.G. Schlegel; J. Gerits; P. Charles & F. Van Gusegem. 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* **162**:328-324.
26. Miranda, c. D., Castillo, G., 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile *Aeromonas sp.* from Chile an freshwater. *Sci Total Environ*, **224**(1-3):167-76.
27. Misra, T.K.; N.L. Brown; D.C. Fritzing; R.D. Pridmore; W.M. Barnes; L. Haberstroh & S. Silver. 1984. Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the begining of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**:5975-5979.
28. Morgenroth; J. & Kaufmann, M. 1912. *Z. Inmunitaetsforch.* **15**:610 (citado en Mitsuhashi, S. 1971. Epidemiology of bacterial Drug

- resistance En: "Transferable Drug Resistance factor R", S. Mitsuhashi, ed. University Park Press. Baltimore).
29. Murray, R., Kilham, L., Wilcot, C., and Finland, M., 1964. Developmental of Streptomycin Resistance of Gram-negative bacilli in vitro and during treatment. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 63: 470-474.
30. Nakahara, H., Ishikawa, T, S., & Kondo I., (1977a) Distributions of Resistances to metals and antibiotics of *Staphylococcal* strains in Japan. Zbl. Bakt. Hyg. y. Abt. Orig. A 237: 470-476.
31. Nakahara, H., Ishikawa, T, S., & Kondo I., (1977b) Heavy Metal Resistance in *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. Pp 217-230.
32. Nakahara, H. & Konzukue, H. 1992. Volatilization of mercury determined by plasmids in *E. coli* isolate from a on aquatic environment. In Drug resistance in bacteria: Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology, De. S. Mitsuhashi. pp. 337-40. Tokio: Jpn. Sci. Soc.
33. Nies, A.; D.H. Nies & S. Silver. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. J. Biol. Chem. 265:5648-5653.

34. Novick, R.P; E. Murphy; T.J. Gryczan; E. Baron & I. Edelman. 1979. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus* : restriction-deletion maps. *Plasmid*. **2**:109-129
35. Nucifora, G.; L. Chu; T.K. Misra & S. Silver. 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid p1258 *cad A* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:3544-3548.
36. Ohtake, H.; C. Cervantes & S. Silver. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **169**:3853-3856.
37. Payne, D. J. 1993. Metallo- β -lactamasas- a new therapeutic challenge. *J. Med. Microbiol.* **39**: 93-99.
38. Pitarangsi, Ch., Echeverria, P., Whitmire, R., Tirapat, Ch., *et al.* 1982. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. Prevalence Among individuals with and without Diarrhea in Thailand. *Infec. Immuno.* **35**: 666-673.
39. Perry, R.D. & S. Silver. 1982. Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **150**:973-976.

40. Ringo, E. Olsen, R. E., 1999. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of *Artic charr* (*Salvelinus alpinus L.*). *J. Appl. Microbio.*, 86(1): 22-8.
41. Rosen, B.P.; U. Weigel; C. Karkaria & P. Gangola. 1988. Molecular Characterization of an anion pump. The *ArsA* gene product is an arsenite (antimonate) stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* 263:3067-3070.
42. Rouch, D. B., T. O. Lee & J. Camakaris. 1989. Genetic and molecular basis of copper resistance in *Escherichia coli*. En: Hamer, D. & D. Winge (eds.) *Metal Ion Homeostasis. Molecular Biology and Chemistry.* Alan R. Liss, New York. p. 439-466.
43. San Francisco, M.J.D.; C. L. Hope; J. B. Owolabi; L. S. Tisa & B. P. Rosen. 1990. Identification of true Metalloregulatory Element of the Plasmid-encoded Arsenical Resistance Operon. *Nucl. Acid. Res.* 9:619
44. Sierra, C. J. 1977. *Reseña histórica de la pesca en México.* Ed. Departamento de Pesca. México. P 99.
45. Silver, S. 1981. Mechanisms of plasmid-determined heavy metal resistances. En: Levy, S. B.; R. C. Clowes & E. L. Koenig (eds.) *Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids,* Plenum Press. New York. pp. 179-189

46. Silver, S.; K. Budd; K.M. Leahy; W.V. Shaw; D. Hammond.; R.P. Novick, G.R. Willsky; M.H. Malamy & H. Rosenberg. 1981. Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **146**:983-96.
47. Silver, S. 1983. Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad. In: Westbroek, P. & E. W. De Jong (eds.) *Biomining and Biological Metal Accumulation*. D. Reidel. Dordrecht. pp. 439-457
48. Silver S. & T.K Misra. 1984. Bacterial transformations of and resistance to heavy metals. In Ommen, G. S. d. A. Holl. (ed). *Genetic Control of Environmental Pollutants*,. New York: Plenum. pp. 23-46
49. Silver, S. & T. K. Misra. 1988. Plasmid-Mediated Heavy Metal Resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:717-743.
50. Silver, S. & M. Walderhaugh. 1992. Regulation of chromosomal and plasmid cation and anion transport systems. *Microbiol. Rev.* **56**: 1-33.
51. Silver, S., & Phung, L.T., (1996) Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. *Annu. Rev. Microbiology.* **50**: 753-789.

52. Smith, K. & R.P. Novick. 1972. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 112:761-762.
53. Summers, A. O. & S. Silver. 1978. Microbial transformations of metals. Ann. Rev. Microbiol. 32:637-672.
54. Trust T. J. et al. 1980 Additional surface protein in autoaggregating strains of atypical *Aeromonas salmonicida*. FEMS. Microbiol. Lett; 9:35-8.
55. Tynecka, Z.; Z. Gos & J. Zajac. 1981. Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 136:983-96.
56. Vaca, S.; R. Miranda & C. Cervantes, 1995. Inorganic-ion resistance by bacteria isolated from a Mexico City freeway. Antonie van Leeuwenhoek. 67:333-337.
57. Walsh, T. R., Payne, D. J., MacGowan, A. P., (1991), A clinical of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible beta-lactamases : a cephalosporinase, a penicillinase, and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. Department of Microbiology and Pathology. University of Bristol. UK.

CON
FALLA DE ORIGEN

58. Walter, E.G. & D.E. Taylor. 1989. Comparison of tellurite resistance determinants from the IncPa plasmid RP4Ter and the IncHIII plasmid pHH1508a. *J. Bacteriol.* 171:2160-2165.
59. Watanabe, T., 1963. Effective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 227: 87-115.
60. Xian-Zhi Li, Hiroshi Nikaido & Kurt E. Williams, 1997. Silver-resistant Mutans of *Escherichia coli* Display Active efflux of Ag⁺ and are Deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179: 6127-6132.