

79
28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

**MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LOS
MICROORGANISMOS A LOS METALES
PESADOS Y SU APLICACION EN LA
CONTAMINACION AMBIENTAL**

**NADINE ESPERANZA MINERO ALFARO
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



1988

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



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.

INDICE

1. INTRODUCCION
2. OBJETIVOS
3. GENERALIDADES
 - 3.1 Contaminación Ambiental
 - 3.1.1 Ecología y Contaminación
 - 3.1.2 Contaminación en la Ciudad de México
 - 3.1.3 Contaminación por Metales Pesados y Metaloides
 - 3.2 Movilización de los Metales Pesados Vía Microbiana
 - 3.3 Plásmidos y Transposones que Codifican Resistencia a Metales Pesados
 - 3.3.1 Plásmidos
 - 3.3.2 Transposones
4. MECANISMOS DE TRANSFORMACION DE LOS METALES PESADOS Y MICRO-ORGANISMOS INVOLUCRADOS
 - 4.1 Mecanismo de Transformación del Mercurio y sus Derivados
 - 4.1.1 Ciclo del Mercurio en la Biosfera
 - 4.1.2 Reducción de Compuestos Inorgánicos del Mercurio
 - 4.1.3 Oxidación del Mercurio
 - 4.1.4 Metilación del Mercurio inorgánico (Hg^{2+})
 - 4.1.5 Transformación de Compuestos Orgánicos del Mercurio.
 - 4.1.6 Plásmidos que Codifican Resistencia al Mercurio y sus Derivados.
 - 4.1.7 Mecanismos de Resistencia de los Microorganismos al Mercurio y sus Derivados.

- 4.2 Mecanismos de Transformación del Cadmio y sus Derivados.
 - 4.2.1 Metilación del Cadmio
 - 4.2.2 Plásmidos que codifican Resistencia al Cadmio.
 - 4.2.3 Mecanismos de Resistencia de los Microorganismos al Cadmio.
- 4.3 Mecanismos de Transformación del Zinc.
 - 4.3.1 Mecanismos de Resistencia de los Microorganismos al Zinc.
 - 4.3.2 Plásmidos que Codifican Resistencia al Zinc.
- 4.4 Mecanismos de Transformación de la Plata y sus Derivados.
 - 4.4.1 Efecto de los Iones Plata en el Metabolismo de los microorganismos.
 - 4.4.2 Plásmidos que Codifican Resistencia a la Plata.
- 4.5 Mecanismos de Transformación del Cromo, Cobalto y Níquel.
 - 4.5.1 Plásmidos que Codifican Resistencia al Cromo , Cobalto y Níquel.
- 4.6 Mecanismos de Transformación del Cobre.
- 4.7 Mecanismos de Transformación del Molibdeno, Tungsteno y Vanadio .
- 4.8 Mecanismos de Transformación del Plomo.
 - 4.8.1 Metilación del Plomo
 - 4.8.2 Inmovilización Microbiana del Plomo.
 - 4.8.3 Plásmidos que Codifican Resistencia al Plomo.
- 4.9 Mecanismos de Transformación del Estaño.
- 4.10 Mecanismos de Transformación del Antimonio.

5. MECANISMOS DE TRANSFORMACION DE LOS METALOIDES Y
MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS.

5.1 Mecanismos de Transformación del Arsénico y sus
derivados.

5.1.1 Ciclo del Arsénico en la Naturaleza

5.1.2 Oxidación del Arsenito

5.1.3 Reducción del Arsenato

5.1.4 Metilación de Compuestos Arsenicales

5.1.5 Plásmidos que Codifican Resistencia al
Arsenito y Arsenato.

5.2 Mecanismos de Transformación del Telurio y Selenio.

5.2.1 Transformación del Selenio y sus Derivados.

5.2.2 Transformación del Telurio u sus Derivados.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

*Hablo por todos: por los seres que vuelan,
y por los que nadan
por aquéllos que habitan regiones húmedas y áridas,
por las bestias , los reptiles, que al igual
que las flores y las gemas
entornarán su canto agradecidos por un ambiente
mejor*

Christopher Smart

1722-1771

1. INTRODUCCION

Durante algún tiempo, los metales pesados se utilizaron ampliamente como agentes terapéuticos, sin embargo, la medicina moderna ha descartado su aplicación debido a su elevada toxicidad y a la existencia de fármacos antimicrobianos menos tóxicos y más eficaces (269). De hecho, la importancia -- actual de este tipo de elementos radica en la seria amenaza que representan para la salud pública, ya que se encuentran distribuidos en el medio ambiente alcanzando concentraciones no compatibles con la vida. En este sentido, los trabajos recientes sobre contaminación ambiental contemplan el estudio minucioso de metales tales como Hg, Cd, Zn, Ag, Co, Cr, Ni, Cu, Pl, Sn, Sb y los metaloides As, Te, Se, para establecer tanto los trastornos que ocasionan a los seres vivos como los recursos que podrían disminuir su toxicidad [68,249,269].

En las ciudades metropolitanas y lugares cercanos, el proceso de urbanización e industrialización ha -- provocado cambios perjudiciales en cuanto a la contaminación - ambiental, ya que ello ha generado directo o indirectamente, - efectos contra la salud física y mental de los individuos y el deterioro de la fauna y la flora.

En la mayoría de las ciudades con grandes problemas de contaminación, está se debe al crecimiento -- desmedido de la población y todo lo que esto representa, a la gran concentración de todo tipo de vehículos y a las descargas no controladas (en el aire y agua) de desechos residenciales - y de los procesos de las industrias, (179, 175, 268, 269).

En los grandes ríos del Sur de la República Mexicana se pueden observar los efectos de la contaminación y el deterioro por destrucción de la fauna acuática. El - Río Papaluapan recibe tanto las descargas de aguas negras de - todas las poblaciones adyacentes como las aguas residuales de algunos ingenios azucareros y una planta de papel. Lógicamente estas aguas afectan la salud de quienes habitan en las pobla-- ciones rurales y los creaderos de ostión, como ocurre en la -- Bahía de Alvarado, Algo semejante sucede en el Río Coatzacoalcos, debido a los desechos de las industrias petroleras y de - las regiones azufreras. Desgraciadamente, muchos ríos de la República Mexicana se encuentran contaminados en forma peligrosa, apareciendo en ellos productos químicos, metales pesados y ---

otras sustancias tóxicas que afectan a todos los seres vivos.- Existen evidencias de muerte en habitantes de los Moctis, Si-naloa por ingestión de agua contaminada con Arsénico y Mercurio; y recientemente en Coscomatepec, Veracruz por ingestión de agua contaminada con Plomo. Contaminación semejante existe en la zona del Mezquital, Torreón y Baja California (183).

La contaminación, es el precio que debe pagar una comunidad por su industrialización, no es un problema médico ni de educación, sino es un problema político-económico. Se debe de promover una mejor educación, planificación y conciencia de los problemas ambientales a todos los niveles, - para que disminuyan toda una serie de tensiones y agresiones - que afectan la conducta y salud del hombre de nuestra sociedad actual.

En la Ciudad de México, los metales pesados ocupan el segundo lugar entre los contaminantes más usuales y provienen de las industrias químicas, metalúrgicas y de la combustión de la gasolina (269,268).

Con la elevada concentración de metales pesados en el medio ambiente, el uso desmedido de fertilizantes herbicidas, insecticidas, fungicidas y la descarga inadecuada de aguas de desecho industrial, los microorganismos generan mecanismos de resistencia a compuestos tóxicos, adaptándose así al medio ambiente. La mayoría de los microorganismos que habitan

estas zonas , llevan acabo transformaciones químicas de algunos metales pesados (Reducción , Oxidación , Degradación de compuestos orgánicos, Métilación y Dimetilación). Estas transformaciones constituyen un mecanismo de resistencia , que en general es codificada por moléculas de DNA extracromosomal (Plásmidos) (41).

La transformación de los metales pesados vía microbiana , es de gran importancia en el control de la contaminación ambiental. Los microorganismos pueden transformar los metales de gran toxicidad en formas menos tóxicas o bien los acumulan intracelularmente , contribuyendo a la desintoxicación del medio ambiente . Algunos reportes indican que la compañía de películas fotográficas Kodak utiliza microorganismos para transformar y bioacumular la plata , y el laboratorio Oak Ridge para bioacumular uranio, de sus desechos industriales . Actualmente se estudia la posibilidad de utilizar microorganismos que transformen y acumulen el cadmio, plomo y arsénico para la desintoxicación de agua y sedimentos de mares , ríos y lagos contaminados (68 , 214 , 229).

Países en gran desarrollo como Japón , utilizan algunos géneros microbianos como Pseudomonas sp., Escherichia sp., Thiobacillus sp., Stibiobacter sp. , Alcaligenes sp., y Clostridium sp., para limpiar los desechos industriales y clínicos altamente contaminados con metales pesados (68 , 214).

2. OBJETIVOS

- Describir los mecanismos de resistencia de los microorganismos a los metales pesados.
- Mencionar los mecanismos de las transformaciones de los metales pesados y los microorganismos involucrados en estas.
- Enumerar los factores que favorecen las transformaciones vía microbiana.
- Relacionar la importancia de tales transformaciones con la ecología y salud pública.

3. GENERALIDADES

3.1 CONTAMINACION AMBIENTAL

3.1.1 Ecología y Contaminación

Nuestro planeta puede considerarse como una nave espacial que viaja al rededor del sol a una velocidad superior a los 29 Km/segundo. A bordo hay cerca de 4,000 millones de personas y una dotación limitada de aire ,agua y tierra . Esta provisión , tal como sucede con el oxígeno dentro de una nave espacial, tiene que ser constantemente usada ,purificada y reutilizada.

La Tierra, se encuentra cubierta por una finísima envoltura de aire y corteza de tierra y agua , a lo que se denomina Biosfera y es la que permite la existencia de todos los seres vivientes como nosotros mismos , los animales y las plantas(56).

La naturaleza utiliza constantemente las mismas cantidades de agua , aire y suelo . El agua de los mares lagos y ríos , se evapora y flota en el aire como pequeñas gotas invisibles , formando las nubes . Tarde o temprano , la misma agua regresa a la tierra en forma de lluvia , nieve o granizo . El agua alimenta a las plantas , escurre sobre el suelo y las rocas , llegando hasta los ríos , arrastrando algunas impurezas durante su trayecto . Los ríos desembocan a los mares y consecuentemente el ciclo se repite (56,176)

Además de ser un sistema cerrado , la biosfera es también un sistema dinámico y limitado . Dinámico , por que existe una constante interacción entre sus elementos , como el agua , aire y tierra , esta interacción permite que se lleven acabo los ciclos mediante los cuales la naturaleza purifica a sus elementos (176,263) . Además de las características anteriores , el sistema es limitado , y para que se conserve la vida en él se requiere de ciertas condiciones como una determinada temperatura , presión , etc. .

La mayoría de los autores definen a la Eco-
logía como " La ciencia que estudia las condiciones de existencia de los seres vivos y las interacciones de la naturaleza que suceden entre éstos y su medio ambiente . El medio ambiente , a su vez , es el espacio que ocupa cada ser vivo , en el que se encuentra todo lo que satisface sus necesidades . Todos los organismos vivos (humanos , animales , y vegetales) se encuentran sometidos , dentro del medio en que viven , a los efectos simultáneos de diversos agentes : variaciones de clima ,

características del suelo , composición química del agua , etc. A estos agentes se les denominan Factores ecológicos , y actúan en forma distinta en cada ser vivo.

En los últimos años , la Tierra sufre fallas y desperfectos debido al mal uso de los recursos que ofrece la naturaleza . Se podría decir que el planeta está enfermo.

La combinación de diversos productos químicos con materias primas como la madera y los metales , alteran peligrosamente los sistemas que hacen funcionar correctamente a la naturaleza . En esta alteración intervienen: la fabricación de aparatos como refrigeradores , automóviles , aviones , la construcción de grandes ciudades ; el uso de fertilizantes y plaguicidas ; la fabricación de medicinas ; la creación de la energía eléctrica empleando : carbón , petróleo y hasta átomos.

Una de las formas de deterioro es la contaminación ambiental , consecuencia de los actuales sistemas de producción , distribución y consumo , así como de los hábitos de la sociedad moderna . La Contaminación es " presencia en el medio ambiente , de materia o energía producidos naturalmente o vertidos por el hombre , en cantidades y concentraciones elevadas durante un tiempo suficiente para perjudicar , causar molestias , amenazar la salud de las personas , animales o plantas , dañar los bienes y obstaculizar el disfrute razonable de la naturaleza" (56,61,176)

La contaminación ambiental puede ser de origen natural , como la presencia de polen en la atmósfera, o artificial , como derramar petróleo en el mar . Contaminante

es toda materia o substancia , sus combinaciones o compuestos, que al incorporarse al aire , agua o tierra pueden alterar o modificar sus características naturales o las del medio ambiente . La contaminación ambiental provoca , de inmediato, el deterioro del medio , que se caracteriza por el empobrecimiento o agotamiento de los recursos, por ejemplo: de los minerales , aguas , suelos y la vegetación, por la perturbación del medio físico (modificación de la temperatura , sedimentación) y el deterioro social (grandes ciudades , pérdida del paisaje urbano y rural). Con la contaminación llegan al medio ambiente cambios indeseables : el aire y el agua con impurezas y sustancias tóxicas además de la erosión de los suelos antes fértiles . Estos inconvenientes ponen en peligro la vida de los peces , pájaros , y otras especies silvestres , además del hombre (61,289).

La contaminación del aire es un peligro creciente para la salud del hombre . A pesar de que el transporte y la industria son muy importantes en la vida productiva de un país , causan graves efectos en la calidad del aire si no se controlan las emisiones de humos , polvos y gases . Los principales contaminantes del aire son las partículas sólidas o polvos generados por tolvaneras , plantas de energía eléctrica, fábricas de cemento , fundidoras de acero , las refinerías de petróleo y los automóviles . Entre los principales contaminantes se encuentran también los óxidos de azufre , que provienen de la combustión del petróleo , del carbón , de la madera y procesos metalúrgicos , los hidrocarburos producidos por refinerías de petróleo , automóviles , evaporación de solventes y gasoli-

na ; los óxidos de nitrógeno , el monóxido de carbono y por último , los oxidantes fotoquímicos producidos por la luz solar que actúa sobre emisiones de motores y plantas industriales .

Cuando el agua se encuentra contaminada por fosfato o metales , se rompe el equilibrio ecológico de los lagos , ríos y mares , y como consecuencia disminuye la cantidad de líquido , vida animal y vegetal . Igualmente perjudicial resulta la contaminación de las aguas litorales y zonas portuarias en las que se afecta la vida y calidad de peces , mariscos y aves (5,68,146) .

Las fuentes de contaminación del agua son muy numerosas , siendo las más importantes las descargas de aguas negras domésticas y de hospitales , las descargas de plantas industriales , los residuos de fertilizantes , plaguicidas y alimento para ganado (289) .

Más del 25 % de la superficie del planeta es tierra cultivable ; el 78 % es agua o tierra cubierta por hielo . Las selvas y bosques vírgenes cubren un tercio de toda el área de la tierra firme , por lo tanto las siembras ocupan menos del 10% de esta área (61,269) .

La producción de alimentos no puede aumentar al igual que la población , que cada vez es mayor ; consecuentemente la proporción entre las hectáreas cultivadas y el número de habitantes tiende a disminuir (61) .

En la medida en que el hombre trata desesperadamente de aumentar la producción de alimentos , pone en riesgo su planeta , por que los sistemas empleados para incrementar el rendimiento agrícola y pecuario , generalmente em-

pobrecen y contaminan seriamente los suelos fértiles , de esta forma , la labranza intensiva aumenta la producción , pero provoca la pérdida del medio ambiente y de numerosas especies silvestres ; los plaguicidas acaban con las plagas , pero pueden dañar al ser humano y a la vida silvestre en general ; los fertilizantes incrementan el rendimiento ,pero causan la contaminación de las aguas ;la irrigación con agua contaminada genera alcalinidad de los suelos ;la explotación forestal provee de maderas para infinidad de usos ,pero provoca la erosión y el empobrecimiento de los suelos.

Otros vehículos de la contaminación son las basuras y desperdicios que se generan en los centros urbanos como metales , vidrio , papel , cartón , detergentes , explosivos , productos químicos , y plástico.

La contaminación ocasionada por el hombre no desaparece , sino que rompe el equilibrio ambiental , debido a la descarga en la atmósfera , suelos y agua,de un número mayor de impurezas algunas de las cuales pueden llegar a ser degradadas .

Los alimentos contaminados , son un problema mundial,especialmente grave en los países en vías de desarrollo .Esta contaminación puede ser de índole biológico , por gérmenes , o bien por agentes químicos ;ambos tipos de contaminantes penetran en el aparato digestivo ocasionando daño directo local o sistémico , ya que se difunden vía sanguínea(138,263).

Por estas razones el hombre debe de conocer sus limitaciones en relación al aprovechamiento de su medio,

al respeto ecológico de sus recursos naturales, a la planeación de sus poblaciones, a la administración creativa de los ecosistemas y sobre todo, a la conservación del medio ambiente. Esto requiere de restricciones políticas, legales, económicas, y morales, basadas en la libertad, en el conocimiento y en la investigación de los problemas del medio ambiente para controlar y prevenir su deterioro.

3.1.2 Contaminación en la Ciudad de México.

Actualmente la Ciudad de México junto con São Paulo, se consideran las ciudades más contaminadas del mundo, mucho más que Tokio, Nueva York, Los Angeles y Londres (250,269). Particularmente en la Ciudad de México se observa un aumento de contaminantes químicos en la atmósfera. Estos compuestos se unen a las partículas de polvo provenientes de zonas aledañas y otros compuestos como los hidrocarburos y los óxidos de nitrógeno, que mediante la acción de los rayos solares forman la contaminación fotoquímica. A este complejo de contaminantes físico-químicos se les atribuyen frecuentemente fenómenos de irritación de los ojos y las vías respiratorias superiores (Bronquitis crónica) (56,138).

Los factores que contribuyen a la contaminación en el Distrito Federal son varios, entre los que se pueden mencionar:

- La Ciudad de México es una cuenca, en donde el movimiento de aire es restringido.
- La altitud a la que se encuentra situada la ciudad favorece la formación de ozono.

- Los vientos dominantes (del sector norte, donde se encuentran la mayor parte de las industrias) barren los contaminantes sobre la zona urbana .
- Inadecuado control de vehículos en mal estado .
- El combustible, que queman las plantas termoeléctricas, centros deportivos, baños públicos, panaderías, tintorerías, etc., contiene un alto porcentaje de azufre.
- La gasolina tiene un alto contenido de plomo.

En el Distrito Federal circulan día con día más de 2 millones de vehículos y en su periferia, se encuentran en funcionamiento 8 mil fábricas, 600 de las cuales son consideradas altamente contaminantes . Las fábricas emiten principalmente Dióxido de azufre y partículas , a diferencia de los automóviles, que emiten Monóxido de Carbono y Oxidos de Nitrógeno . Los automóviles contribuyen con un 95 % del monóxido de carbono en el ambiente; las centrales termoeléctricas , las refinerías y las fábricas de papel , con un 85 % del Dióxido de azufre (27, 138) .

Cuando en el aire se registran altas concentraciones de Dióxido de azufre y partículas suspendidas , se incrementa la mortalidad entre personas con problemas del corazón y enfermedades pulmonares . El Dióxido de azufre reacciona en la atmósfera para producir otros compuestos como el ácido sulfúrico, sulfatos y sulfitos , los cuales irritan el sistema respiratorio. El monóxido de carbono , al inhalarse, e incorporarse a la sangre, se une a la hemoglobina para formar ---

La Carboxihemoglobina , incapaz de transportar oxígeno a todo el organismo , además debilita las contracciones del corazón. El Dióxido de Nitrógeno irrita los pulmones , causa bronquitis y neumonía , además de bajar la resistencia a infecciones. El Ozono , el principal contaminante fotoquímico , irrita los ojos , membranas de la nariz y garganta , además disminuye la capacidad para realizar ejercicio (27,38,250).

Las partículas suspendidas son pequeños núcleos de polvo , agua , metales pesados , silicatos y óxidos de azufre y nitrógeno que se encuentran suspendidos en la atmósfera durante horas , días e incluso meses . Estas partículas son de importancia debido a que en su superficie se llevan a cabo distintas reacciones químicas y fotoquímicas . , en las que se producen compuestos más nocivos que la misma partícula , como en el caso de los óxidos de azufre y nitrógeno que se transforman en ácidos al reaccionar con moléculas de agua , dando lugar a la "lluvia ácida" que tiene efectos terribles en los seres vivos , porque contaminan aire , ríos y mares . Las partículas suspendidas producen enfermedades como las alergias, atrofia de alveolos pulmonares e incluso efisema pulmonar. El Mercurio , Cadmio , Plomo y arsénico , acumulados en cantidades considerables en el organismo pueden causar la muerte (27,250).

Las partículas suspendidas en el aire constituyen el segundo gran contaminante del Valle de México y su eliminación depende de medidas drásticas en el uso de los combustibles que se utilizan para los vehículos y las industri-

as (27).

En la actualidad la contaminación en el Valle de México , alcanza niveles peligrosos para la salud de sus habitantes , debido a que en 10 años , la emisión de contaminantes en la atmósfera ha aumentado un 150 % , alcanzando la cifra de 6 millones de toneladas anuales aproximadamente , de los cuales el 75% son de origen vehicular . En el centro de la Ciudad de México , los criterios oficiales de referencia en la calidad del aire se rebasan en 330% para el ozono , en 46% para el monóxido de carbono y el 156% para partículas suspendidas (27,269).

A medida que la Ciudad de México crece, aumenta la cantidad de basura , desechos industriales , agua contaminada , suelos erosionados , ruido y humo , convirtiéndose en la Ciudad más poblada del mundo y una de las más contaminadas . Durante el año de 1983 se arrojaron a la atmósfera 5 millones de toneladas de contaminantes (60,250,269).

3.1.3 Contaminación por Metales Pesados y Metaloides.

3.1.3.1 Clasificación de metales

De los elementos químicos que conforman la tabla periódica , los metales son los más numerosos. El término metal se designa a aquellos elementos que son buenos conductores de la electricidad , con alta conductividad térmica , alta densidad , dúctiles y maleables . Algunos elementos no metales exhiben una o más de estas propiedades ; como el Boro , Silicio , Arsénico , Telurio y Selenio . A estos elementos que poseen cierto carácter metálico se les llaman metaloides y se encuentran

situados entre los metales y no metales(Fig.No. 1).

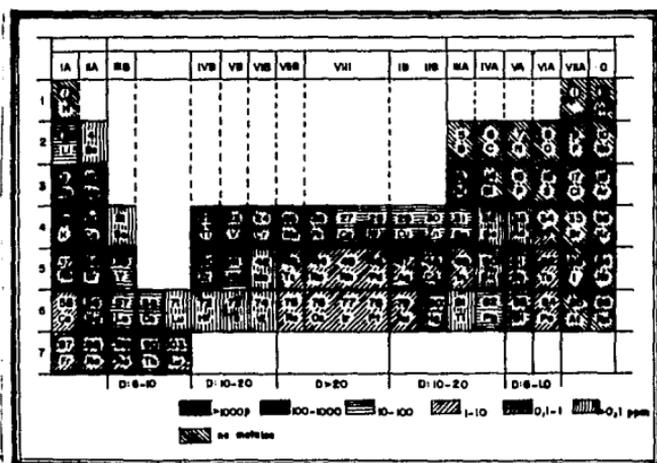


Fig.No.1 Tabla Periódica de Elementos.

Es de interés señalar, que los elementos más abundantes en la naturaleza son: el Aluminio(7.5%), Hierro (4.7%), Calcio (3.4%), Sodio(2.6%) , Potasio (2.4%) ,Magnesio (1.9%) y Titanio (0.6%).

Los metales pueden reaccionar aceptando un par de electrones(ácido de Lewis) o bien donando un par de electrones (base de Lewis). Algunos investigadores clasifican a los metales donadores o aceptores de pares de electrones en 2 categorías: "debilmente aceptor o donador y fuertemente aceptor o donador de electrones" . En la Tabla No.1 se presen-

ta la clasificación de los metales según Pearson (68).

Tabla No. 1 Clasificación de metales.		
aceptor fuerte de electrones	Intermedio	aceptor débil de electrones
$H^+, Na^+, K^+, Ba^{2+}, Mg^{2+},$ $Ca^{2+}, Mn^{2+}, Al^{3+}, Cr^{3+},$ $Co^{3+}, Fe^{3+}, As^{3+}$	$Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+},$ $Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}$	$Cu^+, Ag^+, Au^+, Tl^+, Hg_2^{2+},$ $Pd^{2+}, Cd^{2+}, Pt^{2+}, Hg^{2+},$ CH_3Hg^+
donador fuerte de electrones $H_2O, OH^-, F^-, Cl^-, PO_4^{3-}$ $SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, O^{2-}$	Intermedio Br^-, NO_2^-, SO_3^{2-}	Donador débil de electrones $SH^-, S^{2-}, RS^-, CN^-, SCN^-,$ $CO, R_2S, RSH, RS-$

Como regla general los aceptores fuertes de pares de electrones reaccionan con mayor facilidad con los donadores fuertes de electrones y viceversa. La movilidad de los electrones así como la polaridad y electronegatividad son criterios básicos para esta clasificación. Un aceptor fuerte se caracteriza por baja polaridad, electronegatividad y alto estado de oxidación. De manera similar un donador fuerte de electrones se caracteriza por baja polaridad, alta electronegatividad y alto estado de oxidación.

Los criterios anteriores explican porque ciertos metales como el Hg^{2+} , Hg_2^{2+} o el Pb^{2+} forman enlaces con el S^{2-} o los grupos sulfhidrilos.

3.1.3.2 Metales de transición y metaloides.

De todos los metales, los de mayor importancia ecológica son los metales pesados o de transición, de-

bido a que el aumento en su concentración, puede causar efectos negativos o positivos en plantas, animales y humanos. Por desgracia, en los últimos años la concentración de estos metales aumenta debido a la gran contaminación por desechos industriales y ambientales (168, 258, 263, 264).

Algunos elementos de transición son esenciales para la vida como en el caso del Magnesio (30 mg/70Kg), Hierro (7,000 mg/70 Kg), Cobalto (1mg/70 Kg), Cobre (150mg/70Kg), Zinc (3,000 mg/70 Kg) y molibdeno (5 mg/ 70 Kg de peso corporal). Estos metales son capaces de formar compuestos estables con proteínas y actúan como cofactores de muchas enzimas, pero en exceso, al igual que los metales pesados no esenciales, son tóxicos y letales para el organismo.

Algunos factores como: temperatura, pH, concentración de oxígeno, salinidad, luz, forma del metal en el medio (inorgánica u orgánica), la presencia de otros metales y las condiciones en que se encuentran los organismos, influyen en la toxicidad de los metales de transición. Desde el punto de vista de contaminación ambiental, los metales se clasifican con base en 3 criterios (Tabla No.2) (214, 263):

- No crítico, pero muy insoluble y raro,
- Tóxico pero muy raro,
- Muy tóxico y relativamente accesible.

Tabla No. 2 Clasificación de los elementos de acuerdo a su toxicidad y accesibilidad.

No crítico				Tóxico pero muy raro e insoluble			Muy Tóxico y relativamente accesible.			
Na	N	Br	Si	Ti	Re	Ru	Be	As	Pt	Bi
K	C	F		Hg	Ga	Ba	Co	Se	Au	
Mg	P	Li		Zn	La		Ni	Te	Hg	
Ca	Fe	Rb		W	Os		Cu	Pd	Tl	
H	S	Sr		Nb	Rh		Zn	Ag	Pb	
O	Cl	Al		Ta	Ir		Sn	Cd	Sb	

En la Tabla No. 2 se observa que todos los metales pesados de importancia en la ecología y contaminación ambiental se encuentran en la tercera clasificación, es decir, son tóxicos y accesibles para los organismos. Dentro de los metaloides, el Arsénico, Telurio y Selenio son importantes contaminantes del medio ambiente (25,66,69,168).

3.1.3 .3. Importancia de la Contaminación Ambiental por metales y metaloides .

Durante el año de 1950, en la Bahía de Minamata, Japón, se presentan en personas adultas y niños problemas neurológicos, además de muerte, por ingestión de pescado y moluscos. Al estudiar las aves y peces de la región se detectan elevadas concentraciones de compuestos mercuriales. Hasta 1959 se revela que la causa de la muerte de los habitantes de Minamata se debe a la ingestión de alimentos (pescado) contaminados con Metil mercurio (68,112,224,269).

Los desechos inorgánico y orgánicos que se encuentran en el medio acuático, provienen de las aguas residuales de industrias, domésticas y de hospitales (5,269). Estos desechos son una fuente de nutrientes para los micro-

organismos , que son capaces de acumular e incorporar metales tóxicos .Subsecuentemente los peces pequeños que acumulan estas sustancias , son el alimento de peces mayores, que a su vez son consumidos por el hombre ,que sufre sus efectos tóxicos (4,5,66,178,203).

La contaminación por Mercurio y metilmercurio en la Bahía de Minamata , se debe a la descarga de aguas residuales provenientes de industrias químicas que manufacturan plástico (PVC) .Este no es el único caso de contaminación por mercurio .Investigaciones realizadas en Suecia ,revelan una alta concentración de compuestos mercuriales en agua salada , dulce y en organismos acuáticos, capaz de disminuir la población de algunos pájaros habitantes de la zona (la mayoría en extinción) . Hasta 1967 se demuestra que la contaminación , se debe al uso de fungicidas mercuriales (239,269).

En 1972 se descubre la contaminación por mercurio más severa , en trigo tratado con etil-mercurio,p-tolueno sulfonamida como fungicida . Como consecuencia de la ingestión del trigo contaminado , más de 100,000 personas están permanentemente incapacitadas y 450 personas fallecen (9). En Ghana y Canadá se reportan síntomas de intoxicación por mercurio , al ingerir pescado contaminado con metilmercurio (82,83,178,238,269).

Sin duda alguna,el mercurio es el metal pesado más tóxico , pero el Cadmio,Plomo , y otros metales , frecuentemente causan problemas en la ecología e intoxicaciones crónicas y agudas en humanos , por ingestión de agua y alimentos contaminados (4,85). En 1930 , en Leipzig,Alemania

se reconocen 250 casos de intoxicación por ingestión de agua contaminada con plomo (25 mg/l) y en 1968 se descubre en la aldea cercana al río Jintsu, Japón intoxicación crónica en personas que consumían frecuentemente alimentos contaminados con Cadmio (0.68 g/g).

Algunos informes revelan el descubrimiento de intoxicaciones por cobre (2.5 g/l) en Holanda, por cromo en Japón, por arsénico en Taiwan (2.5 mg/l de agua de mar) y en Torreón, México (1988) (4-6 ppm) al ingerir agua contaminada; además recientemente se detecta una concentración elevada de cobre en el salmón del Atlántico (5, 45, 68, 203, 269).

En E.U.A. se encuentran muchas reservas ecológicas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos de selenio, como lo es el Valle de San Joaquín, en donde se encuentran las reservas de Volta y Kesterson (2, 28 22, 146). En un medio ambiente alcalino, peculiar en las áreas antes mencionadas, el selenio se moviliza en el agua y se acumula en peces y aves acuáticas, las cuales se alimentan de algas que contienen importantes concentraciones de este metal y sus derivados (3, 52, 145).

En 1983 FWS (Servicio de Vida Salvaje, Terrestre y Acuática) determina una alta incidencia de muerte y deformidades en aves acuáticas como: Negretas, Colimbos, Zanco de manto (ave del orden de los zancudos del género Himantopus) y patos, incluyendo embriones con pico torcido, sin ojos, alas y el cerebro fuera del cráneo. Se encuentra que la acumulación de selenio en el mosquito pescado es muy alta

(53 ppm) y como consecuencia de esta contaminación la mortalidad entre ellos es muy elevada (211).

En el Río de San Joaquín ,California, se encuentran niveles de 47,000 ppm de selenio , 4 veces más que el nivel necesario para calificarlo como tóxico (28,52.).

3.1.3.4 Estándares o Concentraciones máximas permitidas de metales pesados y metaloides.

Con el propósito de proteger la salud y vida del hombre , animales y vegetales , se establecen , estándares o concentraciones máximas permitidas de metales pesados y metaloides para el agua, aire y alimentos. Estos estándares protegen el medio ambiente y al hombre , animales y plantas, además de disminuir la contaminación por estos metales .

Para determinar la concentración máxima permitida por cada país se consideran los siguientes factores:

- Tipo y Grado de exposición,
- Población,
- Estado físico y químico del metal,
- Toxicidad del metal para los animales y el hombre .

En la Tabla No. 3 se presentan los niveles de tolerancia toxicológica de los metales de transición con importancia en la contaminación ,en crustáceos, peces , mamíferos y en el hombre (4,5,7, 68,269).

Tabla No. 3 Niveles de Tolerancia Toxicológica de algunos metales pesados (mg/Kg)

Metal pesado	Crustáceos	Peces	Mamíferos	Hombre
Ag	0.01 - 0.03	0.003 - 0.01	-	0.5
As	4 - 23	1 - 23	2 - 15	2.0
Cd	0.03 - 0.04	3	0.7 - 0.15	50-500
Co	0.05	0.1 - 0.1	0.7 - 1.5	50-500
Cr(VI)	0.3 - 0.7	0.15- 0.19	0.45- 11	0.5-5
Cr(III)	0.03-0.1	1.2 - 200	-	-
Cu(II)	0.08 - 0.8	0.03- 0.8	8(g/l)	8(g/l)
Hg(II)	0.03 - 0.1	0.15- 0.25	0.1 - 1	-
Ni	0.0055-1	0.8 - 55	-	50-100
Pb(II)	3 - 170	0.33- 200	2	-
Sc	183	2 - 10.5	5 -10	0.01
Sn	-	2	-	-
Zn(II)	19.4	1 - 5	1.9- 2.2	-

Por medio de investigaciones clínicas y estudios experimentales se determina el grado de toxicidad de los metales. Basándose en estos estudios los gobiernos de los diferentes países del mundo proponen la concentración máxima de metales de transición que debe contener el agua de desecho (Tabla No. 4).

Tabla No. 4 Concentraciones máximas permisibles de los metales de transición del agua de desecho (µg/l)

Metal	USPH 1962	Japón 1968	URRS 1970	WHO 1971	SABS 1972	NAS 1972	Aus. 1973	USEPA 1975	FGR 1975
Arsénico	10	50	50	50	50	100	50	50	40
Cadmio	10	-	10	10	50	10	10	10	6
Cromo	50	50	100	50	50	50	50	50	50
Cobre	1,000	10,000	100	50	1,000	1,000	1,000	-	-
Plomo	50	100	100	100	50	50	50	50	40
Mercurio	-	1	5	-	-	2	-	2	4
Selenio	10	-	1	10	-	10	10	10	8
Plata	50	-	-	-	-	-	50	50	-
Zinc	5,000	100	1,000	5,000	5,000	5,000	5,000	-	2,000

Las concentraciones máximas permisibles presentadas en la tabla anterior , permiten el control de la concentración de los metales y en consecuencia la disminución de la contaminación ambiental .

3.1.3.5 Fuentes de Contaminación por Metales de Transición.

Las fuentes de contaminación , frecuentemente se encuentran en zonas urbanas y zonas con alto grado de industrialización . Como consecuencia las zonas cercanas a las grandes ciudades e industrias (zonas rurales y regionales) se encuentran también contaminadas (4,178,183,238).

En general , es posible distinguir 5 diferentes fuentes de contaminación por metales de transición y metaloides :

- Fenómenos geológicos,
- Procesos industriales de minerales y metales,
- El uso de metales y sus derivados ,
- Los desperdicios de basura y la emisión de gases de automóviles ,y
- La excreción humana y animal que contenga metales pesados.

En zonas donde hay una gran formación de minerales , se encuentra una elevada concentración de metales en aguas y sedimentos. Estas zonas mineras , son económicamente viables , de gran explotación y de gran actividad humana; pero causan la movilización de los metales que contribuyen a la contaminación . Algunos informes indican que el alto contenido de

metales en rocas , es la causa de elevadas concentraciones de metales en el agua y sedimentos de ríos y lagos , como ejemplo se puede mencionar que el mercurio en rocas del Río La Grande en Canadá, es el responsable de las elevadas concentraciones de mercurio en peces(0.5ppm) , plantas, agua y sedimentos .En Gales , Inglaterra , la contaminación de algunos ríos y lagos es causada por el alto contenido de metales en rocas y zonas mineras cercanas (5,68).

El uso de fungicidas , herbicidas , pesticidas e insecticidas en la agricultura , es otra fuente de contaminación con metales pesados en suelos , agua y plantas(68).

Sin duda alguna , la mayor parte de la contaminación por metales de transición se debe a los desechos y aguas residuales de numerosas industrias(Tabla No.5) (4,27,78,269).

Industrias	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Papelera		X	X		X	X	X		X
Química orgánica y petroquímica	X	X		X	X	X		X	X
Química inorgánica, alcalis y de cloro	X	X		X	X	X		X	X
Fertilizantes	X	X	X	X	X	X	X		X
Refinación del petróleo	X	X	X	X		X	X		X
Fundidoras de acero	X	X	X		X	X			X
Fundidoras de metales	X	X	X		X	X			X
Vehículos de motores y procesadoras	X	X	X		X		X		
Cementos, Asbestos y sus productos, etc.		X							
Productos textiles		X							
Curtidoras de cuero		X							
Termoelectricas		X							X

En la tabla anterior se presenta una lista de los metales pesados que se utilizan en la mayoría de las industrias, entre los cuales, el Cobre, Mercurio y el Cadmio son los metales más empleados. En las refinadoras de petróleo y en la producción de fertilizantes se emplean la mayoría de los metales de transición, en cambio en las curtidoras de cuero solo se usa el cobre. Por los múltiples y numerosos usos de los metales en las industrias, aumenta la contaminación en suelo y agua. Estudios realizados con aguas residuales de algunas industrias en Nueva York, indican que la mayor contribución de Cromo y Níquel a las aguas de esta ciudad provienen de plantas que generan electricidad (termoeléctricas e hidroeléctricas) (Tabla No.6).

Tabla No.6		Contribución de metales al agua residual de la Ciudad de Nueva York.				
Fuente de agua	Concentración del metal en aguas residuales (%).					
	Cu	Cr	Ni	Zn	Cd	
Abastecimiento de agua	20	0	0	7	0	
Plantas que generan electricidad	12	43	62	13	33	
Otras industrias	7	9	3	7	6	
Residencial	47	28	25	42	49	
Otras	0	11	0	0	0	
Efluentes	14	9	10	31	12	
Total (Kg/día)	1160	674	509	1780	73	

La tabla anterior muestra que el agua residual de Nueva York contiene una elevada concentración de Cobre, Níquel, y Cadmio. Estos metales provienen principalmente de las industrias químicas y plantas genero-

ras de electricidad .

El empleo de electrodos de mercurio en la producción de cloro e hidróxido de sodio , es una de las fuentes de contaminación por este metal . Se estima , que una industria química que produce Cloro e Hidróxido de sodio , en 20 años desecha 91,000 Kg de Mercurio (264 , 269). Otros estudios señalan que la mayoría del cadmio y níquel provienen de industrias procesadoras de baterías y algunas veces junto con el zinc provienen de fábricas de televisores ; en Japón el agua residual de estas industrias contiene aproximadamente de 4,820-4,500 ppm de cadmio y cerca de 15,500-37,500 ppm de zinc (68,156).

Las industrias que utilizan compuestos orgánicos que contienen aditivos o estabilizantes como la gasolina contaminan con metales pesados el ambiente .El zinc, estaño , plomo , y cadmio se usan como estabilizantes y aditivos en la síntesis de PVC . El plomo se utiliza en la manufactura de la nitro-celulosa ; el cromo como agente anticorrosivo y el cobre en la lixiviación de los minerales(68,269).

Es importante señalar que la mayoría de las aguas residuales de industrias químicas como las que procesan alimentos , contienen elevadas concentraciones de metales pesados (Tabla No. 7).

Tabla No. 7 Concentraciones de algunos metales pesados en aguas residuales industriales.

Industrias	Cu	Cr	Ni	Zn	Cd
	(concentración g/l)				
Procesadoras de carne	150	150	70	460	11
Clarificación de manteca	220	210	280	3,890	6
Procesadoras de pescado	240	230	140	1,590	14
Comida miscelánea	350	150	110	1,100	6
Cerveceras	410	60	40	470	5
Saborizantes artificiales	2,040	180	220	2,990	3
Helados	2,700	50	110	780	31
Pinturas textil	37	820	250	500	30
Tintorerías	7,040	20,140	740	1,730	115
Químicas	160	280	100	800	27
Lavanderías	1,700	1,220	100	1,750	134
Lavacarros	180	140	190	920	18

La tabla anterior revela, la existencia de grandes concentraciones de metales pesados en aguas residuales de las industrias. Las lavanderías y fábricas de saborizantes artificiales descargan en sus aguas de desecho una elevada concentración de cobre; las industrias textiles y tintorerías descargan cromo y las industrias que procesan el pescado y clarifican la manteca descargan altas concentraciones de zinc (4, 68).

Las aguas de desecho domésticas y de hospitales, también contienen importantes concentraciones de metales de transición, principalmente de cobre, plomo, zinc, cadmio y plata, debido al uso desmedido de antibióticos, desinfectantes y además de detergentes que contienen: Fe, Mn, Co, Mo, Zn, Sr, y B. Los estudios indican que algunos detergentes contienen hasta 31-45 ppm de arsénico (123, 238).

La emisión de gases tóxicos, en los cuales se encuentran partículas suspendidas (metales pesados), es un

importante foco de contaminación . Los metales suspendidos en la atmósfera se transportan por el aire y depositan en diversas superficies como el agua y alimentos , o bien, por medio de la lluvia se depositan en el suelo y plantas . Esta situación es de gran importancia en grandes ciudades donde la emisión de los gases es elevada (27,61,250). Estudios realizados con el aire de ciudades de E.U.A. , revelan la presencia de niveles elevados de antimonio, selenio , plomo , cadmio , mercurio , plata , y en menor concentración de arsénico , zinc , cobre , vanadio , níquel , cromo , y cobalto, los cuales se transportan a través del aire y se depositan por medio de la lluvia en lagos y lagunas. Recientes estudios realizados en las cataratas del Río Niágara, señalan que del 15 - 36% del plomo presente en los lagos y ríos se atribuye a la precipitación atmosférica (5,27,68,79,178) .

Otras fuentes de contaminación son la combustión de basura , la producción de cemento , las plantas generadoras de electricidad, las industrias metalúrgicas, el empleo de metales como anticorrosivos , el uso de aguas negras para riego, y fundidoras de metales (25,68,79,97,123) .

Algunos informes indican que en Ontario , Canadá , la fundidora de cobre Cliff durante 1971 , descarga al aire 2,000 toneladas de níquel , 1800 de cobre , 155 de zinc, 12 de cadmio , 240 de plomo , 110 de arsénico y 17 de selenio . Estas concentraciones ocasionan un fuerte impacto en la ecología y en la vida de animales y humanos (53,61,116,117,178) .

La contaminación por metales pesados tiene un fuerte impacto en las zonas rurales , debido al uso desmedido

de fertilizantes , pesticidas , fungicidas , insecticidas , además del empleo de aguas negras para riego; lo que ocasiona la erosión de suelos agrícolas y la acumulación de metales pesados en verduras y frutas de consumo humano(97,123).

3.2 MOVILIZACION DE LOS METALES PESADOS VIA MICROBIANA.

Los metales de transición que se depositan en el suelo y el agua , por medio del aire y la lluvia , son movilizados , transportados y transformados por microorganismos (68,214,229).

Según las necesidades nutricionales de los microorganismos , los elementos se dividen en 3 grupos:

- los que son necesarios para su metabolismo intracelular , como el potasio y el fósforo,
- elementos que cumplen funciones de regulación o no son necesarios para todos los microorganismos , como es el caso del calcio y los iones cloruro , y
- aquellos elementos que no tienen función biológica alguna y son tóxicos como el mercurio , arsénico y cadmio(214).

La mayoría de los metales pesados , que se encuentran contaminando el suelo , sedimento y agua son transformados y transportados por los microorganismos (238). La movilización de los metales vía microbiana , se lleva a cabo a través de tres mecanismos:

- Degradación de materia orgánica,
- Transformación del metal (oxidación, reducción),
- La conversión de compuestos inorgánicos a compuestos orgánicos (Tabla No. 8) (68, 229).

Tabla No. 8 Transformación de los metales de transición por medio de microorganismos.		
Transformación	metal	Referencia
1. Reducción	As(II)	45, 65, 115, 142
	Hg(I)	107, 125, 181
	Hg(II)	107, 126, 195, 209, 227
	Se(IV)	52, 77, 134, 205, 230, 266
	Te(IV)	234, 244
2. Oxidación	As(III)	45, 64, 65, 187, 245.
	Sb(III)	
3. Metilación	As(V)	20, 32, 45, 65, 187
	Cd(II)	32, 103
	Hg(II)	32, 58, 86, 112, 209
	Pb(II)	32, 194, 207
	Se(IV)	242, 262
	Te(IV)	32, 36, 52, 67, 264
	Sn(II)	194, 223
4. Dimetilación	*RHg-	86, 112, 263, 264
	*RTE-	67, 263
	*RSe-	36, 52, 67, 263
	As(II)	45, 147, 188, 263

* R' = Radical

En la tabla anterior se presentan los mecanismos de transformación de los metales de transición, realizados por microorganismos. Es de importancia mencionar, que los organomercuriales, son los únicos compuestos que se degradan a compuestos inorgánicos por medio de microorganismos (24, 53, 229). En algunos casos, los microorganismos pueden transformar a los metales en compuestos de mayor toxicidad, como el metil-mercurio (214, 263). En otras ocasiones, los microorganismos utilizan

Las transformaciones de los metales como un mecanismo de desintoxicación (49). Para las bacterias , algunas transformaciones sirven como fuente de energía (229).

Las transformaciones de los metales pesados por microorganismos , tienen gran importancia en el medio ambiente debido a que promueven la disminución de la contaminación(49, 68,191,214,229).

El incremento de metales tóxicos en el medio ambiente , ocasiona que los microorganismos adquieran resistencia a estos metales y sinteticen las enzimas necesarias para su transformación ó degradación (49,168). Estos mecanismos de resistencia son altamente específicos y se codifican por medio de plásmidos bacterianos , que también promueven resistencia a la mayoría de los antibióticos y otras características (41,82,83,144,136,157,173). Algunos microorganismos de gran importancia clínica como : Escherichia coli , Klebsiella pneumoniae , Pseudomonas aeruginosa , y Staphylococcus aureus, generalmente portan genes o plásmidos (49,82,83,144,191,238). La resistencia a los metales pesados en ellos, es tan frecuente como la que presentan a los antibióticos (43,83,133,157,158,191,258).

Los mecanismos que controlan la resistencia a los metales pesados son diferentes y la mayoría de las veces son codificados por el mismo plásmido(82,83,133,158,173,191,195, 214,229).

3.3 PLASMIDOS Y TRANSPOSONES QUE CODIFICAN RESISTENCIA

A METALES PESADOS.

3.3.1 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas formadas por una doble hélice de DNA, covalentemente cerrada y autorreplicable (26,34,48,89,170,171).

El término "plásmido" se introduce por Lederberg como un término genérico para elementos genéticos extracromosómicos. Unos 20 años después de su descubrimiento se conoce poco acerca de los plásmidos. Actualmente se sabe que se encuentran frecuentemente en casi todas las especies bacterianas y algunos hongos. El plásmido no es esencial para el metabolismo de la bacteria que lo hospeda y su pérdida es permanente; la célula no lo puede regenerar, únicamente lo puede adquirir de otra bacteria (48,49).

Los plásmidos constituyen solo una parte pequeña del genoma celular: en general, entre 1, 2 ó 3%. Aún así esa pequeña fracción de la información hereditaria determina rasgos genéticos accesorios pero importantes, no codificados usualmente por el genoma bacteriano. Existen plásmidos que portan información para la conjugación bacteriana, y son responsables de ciertas enfermedades humanas (tales como la diarrea de los viajeros y el impétigo), animales y vegetales (89).

Los plásmidos codifican distintas características tales como: resistencia a antibióticos, producción de toxinas, formación de tumores, virulencia, síntesis de endotoxinas y bacteriocinas, adherencia, degradación de compuestos

orgánicos y aromáticos , resistencia a metales pesados y la habilidad para transferirse de una célula a otra (26,33,89). La importancia de estos rasgos genéticos y en particular el interés clínico de la resistencia a antibióticos atrae la atención de los médicos , químicos y biólogos sobre los plásmidos y se comienza a comprender su papel en la genética bacteriana.

En los últimos 10 años, se investigan y manipulan extensamente a los plásmidos .Además de las características mencionadas anteriormente se descubre que son vehículos ideales para introducir en bacterias, material genético extraño mediante las técnicas de Ingeniería Genética. De esta manera se pueden purificar y mutiplicar genes extraños con importancia en la medicina , ecología e industria (33,48,49,80,89, 171,173,214).

Cada plásmido controla autónomamente el número de sus copias que debe haber en la célula huésped. Además la conjugación entre células bacterianas puede llevar al intercambio de plásmidos entre especies e incluso géneros totalmente diferentes incapaces de intercambiar genes cromosómicos. Este intercambio conduce a la transferencia de un plásmido portador de genes que permiten a la bacteria receptora adquirir nuevas características genéticas(26).

3.3.1.1 Descubrimiento de los plásmidos

A principios del año de 1950 ,poco después de que Joshua Lederberg descubriera la conjugación (transferencia de material genético , que requiere como condición esencial, el contacto celular) en la bacteria Escherichia coli; queda claro

que entre las bacterias existen dos tipos "sexuales" determinados genéticamente y que la información genética se transfiere del donador al receptor [76,89]. El Factor F (fertilidad) se transfiere con mayor frecuencia. Lederberg observa que el factor F presenta cierta semejanza con los elementos genéticos extracromosómicos. En 1953 William Hayes deduce que el factor F posee la habilidad de integrarse covalentemente a una estructura, circular donde residen todos los genes de Escherichia coli. El factor F puede integrarse en cualquier lugar del genoma bacteriano [76,171]. Por su capacidad de integración al genoma bacteriano, el factor F y el bacteriofago se les denominan Episomas. Un episoma, es un elemento genético que se puede encontrar en cualquiera de los 2 estados alternativos: integrado o independiente del genoma bacteriano. Durante un tiempo el factor F y el bacteriofago son los únicos episomas conocidos. Pero en 1959 tiene lugar un descubrimiento importante mientras se estudia el caso de pacientes con disentería bacteriana que no responden al tratamiento con antibióticos usualmente eficaces. La bacteria causante del trastorno Shigella dysenteriae, porta genes que le confieren resistencia simultánea a varios antibióticos. Estos genes, además, se transfieren de una bacteria a otras del intestino, de forma parecida al factor F. Estos factores, llamados R de "resistencia" al igual que el factor F, poseen la capacidad de promover su propia transferencia por conjugación [26,76,171].

Poco después del descubrimiento de los factores R en las enterobacterias, se encuentran factores similares en los estafilococos. Este género bacteriano generalmente con-

tiene un gene que codifica para una enzima betalactamasa o penicilinasas , que degrada la penicilina y es responsable de la resistencia a la penicilina . Los factores R de estas bacterias son incapaces de promover su propia transferencia por conjugación , se transfieren pasivamente por Transducción, proceso en el que un fragmento de DNA bacteriano se encapsida en un bacteriófago , en lugar de su propio DNA y al infectar otra cepa bacteriana (receptora) provoca un cambio heredable (30,36). Una proporción importante de los factores R de enterobacterias, tampoco pueden promover su propia transferencia conjugativa y depende de la transducción o de la movilización por otro plásmido conjugativo que se encuentra en la misma célula (170,171,267).

La mayoría de los factores R , se diferencian del factor F en que siempre son extracromosómicos y no se integran reversiblemente en el genoma bacteriano, por lo tanto no satisfacen la definición de episoma y, en 1963 diversos investigadores postulan que los elementos genéticos extracromosómicos móviles de las bacterias se llamen plásmidos en lugar de episomas.

En 1964 , Mark Richmond y Eric Johnston demuestran que los estafilococos, responsables de una serie de infecciones en las suturas quirúrgicas , portan plásmidos que les permite no solo destruir la penicilina , sino también crecer en el desinfectante mercurial que se usa para desinfectar las suturas . Estos plásmidos portan genes que codifican resistencia a la penicilina , a compuestos de mercurio y a varios compuestos de otros metales pesados letales para los microorganismos , como las sales de Cadmio , Bismuto , Plomo , Antimonio , y los iones Arse-

nito y Arsenato [49,173]. Desde entonces , se aíslan y estudian diversos genes responsables de la resistencia a metales pesados comúnmente presentes en plásmidos a partir de microorganismos como: Escherichia coli , Staphylococcus aureus , Pseudomonas aeruginosa y otros [35,49,69,70,172].

Muchos otros tipos de genes especializados se encuentran en plásmidos y no en el genoma bacteriano como: los encargados de la fermentación bacteriana de la leche y de gran parte de la versatilidad metabólica de Pseudomonas spp. , capaces de degradar diversos hidrocarburos complejos. Los genes, que determinan en Bacillus thuringiensis y otras especies, la síntesis de una proteína con actividad insecticida , se encuentran en plásmidos [35,49,171].

3.3.1.2 Resistencia a Antibióticos y Metales Pesados.

La resistencia a antibióticos y otras sustancias tóxicas , es la primera actividad atribuida a los plásmidos , que además , representa un grave problema médico. Diversos investigadores señalan que , por lo menos existen 4 mecanismos diferentes a través de los cuales , los genes presentes en plásmidos , determinan resistencia a sustancias tóxicas y antibióticos . La más sencilla es la simple degradación del antibiótico (penicilina , cloranfenicol) y compuestos del mercurio [34 , 49 , 208 , 224 , 236 , 255]. Un segundo mecanismo consiste en impedir el acceso del tóxico a su objetivo celular , por medio de proteínas que modifican algún sistema específico de transporte a través de la membrana celular, como en el caso del cadmio,

Zinc y otros metales (69, 214 , 224 , 253 , 254 , 255). La resistencia de los microorganismos al ión arsenato y arsenito se debe a un proceso activo de bombeo , los iones entran al interior de la célula sin dificultad pero salen expulsados a la misma velocidad con la que entran (8, 152, 213, 214, 229).). Un tercer mecanismo es la alteración del sitio de interacción del antibiótico y el último mecanismo es la sustitución de la enzima con la cual reacciona el antibiótico (89, 171).

Desde luego estos mecanismos se originan durante el lento curso de la evolución y su antigüedad supera en millones de años a la aplicación clínica de antibióticos y metales pesados. De hecho se encuentran plásmidos R en bacterias aisladas y almacenadas mucho antes de la era de los antibióticos o aislados recientemente en lugares remotos , donde probablemente no están expuestos a antibióticos ni a otras sustancias tóxicas (15, 54).

3.3.1.3 Estructura de los plásmidos

A diferencia de los virus , los plásmidos pueden adquirir nueva información genética , mediante una reorganización para mantener una información genética apropiada a las necesidades actuales de su huésped , sin comprometer la eficiencia de su propia replicación (30). Los plásmidos se pueden estudiar adecuadamente por medio de electroforesis en gel, análisis y secuenciación del DNA por medio de endonucleasas de restricción (13, 15, 19, 34, 46, 26, 88, 89, 119, 204).

Los plásmidos están formados por una doble hélice , en la cual cada cadena constituye una secuencia lineal de 4 bases nucleotídicas : Adenina (A), Guanina (G) , Timina (T) y Citosina (C). Las secuencias de bases de las dos cadenas son complementarias , es decir , la adenina forma par con la timina y la guanina con la citosina(76).Cada enzima de restricción reconoce cierta secuencia de bases y rompe el DNA en un sitio determinado de esa secuencia , produciendo tantos fragmentos cuantos lugares de ruptura existen en la molécula .La electroforesis en gel permite separar fácilmente unos fragmentos de otros, según su tamaño ,aplicando una corriente eléctrica que provoca la migración de las moléculas de DNA a través del gel hacia el electrodo positivo a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de la longitud molecular. Los fragmentos idénticos forman una estrecha banda cuya posición puede observarse tratando el gel con un colorante fluorescencia, como el Bromuro de etidio (que se une al DNA)(15,26,33,88,171).

La disección de un plásmido con varias enzimas de restricción , proporciona varios conjuntos de fragmentos que pueden ordenarse en un mapa de fragmentación con el objeto de conocer la secuencia del plásmido.Examinando los fragmentos del plásmido se puede aprender sobre su estructura y organización genética(199).

El estudio de la estructura y organización genética de algunos plásmidos lleva a Jacoby ,Brenner y Cuzeni a proponer que en todo "replicón" o unidad de replicación ,ya sea el genoma bacteriano ,un segmento de cromosoma eucariótico ,un

virus , un plásmido o cualquier otra forma de material genético , la replicación comienza en un punto específico (origen) avanzando sucesivamente y linealmente hasta un punto fijo de terminación. Una proteína "iniciadora" , codificada por el propio replicón actúa sobre el origen para poner en marcha el proceso de la replicación. Los investigadores proponen que en las bacterias , todos los replicones autónomos están unidos permanentemente a la superficie de la membrana celular en un lugar próximo al plano ecuatorial de la célula; esta unión es esencial para la replicación y el reparto de las copias a las células hijas . En un momento determinado del ciclo celular aparece un nuevo lugar de unión para cada replicación al otro lado del plano ecuatorial , lo que desencadena un ciclo de replicación , durante el cual una molécula de DNA recién sintetizada se ancla al nuevo punto de anclaje . Esta brillante hipótesis , dirige virtualmente todos los estudios posteriores sobre la regulación de la replicación y sobre la base genética de la autonomía de los plásmidos (76, 171) .

Posteriormente Matsubara demuestra que los genes responsables de la autonomía de los plásmidos se encuentran agrupados en el "bloque replicador" ; la delección de cualquier parte de esta región inhibe la replicación. Estudios realizados con el p1258 de Staphylococcus aureus demuestran que el bloque replicador no supera los 3000 pares de bases, que es la décima parte del plásmido.

El bloque replicador típico consta de:
genes relacionados con el origen de la replicación, la proteína

iniciadora y genes estructurales .El elemento central del sistema es el origen de la replicación que es una secuencia de bases en la que se encuentra el sitio real de iniciación de cada ciclo de replicación. El origen se define funcionalmente como la menor secuencia de DNA que puede servir de punto de partida de un ciclo de replicación(76).

El número de copias del plásmido por célula es variable .En general el número de plásmidos se relaciona con su tamaño .Los plásmidos grandes presentan menor cantidad de copias. La replicación del plásmido suele estar regulada independientemente de la del cromosoma. Estudios realizados en el plásmido R1 de Escherichia coli indican que el número de copias se controla por medio de una proteína o proteínas que inhiben la replicación del plásmido. La regulación se controla negativamente , mediante un represor (26). Algunas pruebas sugieren que los plásmidos se replican aleatoriamente durante todo el ciclo celular ; a cada velocidad de crecimiento del huésped corresponde una concentración constante de represor que determina la probabilidad de replicación del plásmido.

3.3.1.4 Incompatibilidad de plásmidos

La incompatibilidad de los plásmidos es la inhabilidad de 2 plásmidos comunes de coexistir establemente en la misma célula huésped(26, 88, 89, 170, 200, 202, 220).

Los plásmidos de Enterobacterias se agrupan según su incompatibilidad en 25 familias, los plásmidos de los Estafilococos en 7 grupos y los de las Pseudomonas en 11

{ 202 }. En la Tabla No. 9 se enlistan los grupos de incompatibilidad de los plásmidos de bacterias entéricas y en la Tabla No. 10 de Staphylococcus aureus.

Tabla No. 9 Grupos de Incompatibilidad de Plásmidos de Bacterias Entéricas		
Grupos de incompatibilidad	Fenotipo	Plásmido prototipo
F1	IncF1	F, R386, (HH)
FII	IncFII	R100, R1
FIII	IncFIII	ColB-K98
FIV	IncFIV	R24
FV	IncFV	Folac
Com5	Inc5	R27, IP
M, Com7	IncM, Inc7	R446b, R69(IP)
Com10	Inc10	R72
Com11	Inc11	R147
A	IncA	RA1
B	IncB	TP113, TP125
C, Com6	IncC, Inc6	R40a, R55
H	IncH	R27, TP117,
I, Com1	IncI ∞ , Inc1	ColIb-P9
II	IncII	R144
I2	IncI λ	R621a, ColIb, IH1420
J	IncJ	R391
L	IncL	R471a
N, Com2	IncN, Inc2	N3, R15
O	IncO	R ¹⁶ , R724
P, Com4	IncP, Inc4	RP4
S	IncS	R478
T	IncT	Rt&L
W	IncW	S-a, R7k

Tabla No. 10 Grupos de Incompatibilidad de <u>Staphylococcus aureus</u>		
Grupos de incompatibilidad	Fenotipo	Plásmido prototipo
1	Inc1	p1524, p1258
2	Inc2	p11147
3	Inc3	pT147
4	Inc4	pS177
5	Inc5	pC221
6	Inc6	pK545
7	Inc7	pVB101

2.3.2 Transposones

Los primeros plásmidos R que se aíslan suelen determinar resistencia a 1 ó 2 compuestos tóxicos (170). En la actualidad no es raro encontrar plásmidos que confieren resistencia hasta a 10 antibióticos o metales pesados, lo que se debe a que los plásmidos adquieren genes que codifican otras propiedades. En 1974 Jacob y Redges confirman que los genes que codifican resistencia se encuentran en unos elementos genéticos nuevos, con capacidad para transferirse físicamente de un lugar a otro del material genético de una célula, sin necesidad de una secuencia complementaria de DNA y sin utilizar enzimas implicadas en los mecanismos de recombinación usuales. Estos nuevos elementos genéticos llamados Transposones son responsables de la acumulación de genes de resistencia y de la reorganización del material genético en bacterias y al parecer también en eucariotes (89,171).

Desde hace unos 3,000 millones de años en que apareció la vida sobre la tierra, la información genética ha ido adicionándose o sustituyendo a la existente. De esta manera, al irse adicionando nueva información los seres vivos han podido realizar mayor número de funciones y su complejidad ha ido en aumento, traduciéndose en una mayor capacidad de aprovechamiento de todas las disponibilidades ofrecidas por el medio ambiente.

4. MECANISMOS DE TRANSFORMACION DE LOS METALES PESADOS Y MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS

4.1 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL MERCURIO Y SUS DERIVADOS.

Los compuestos inorgánicos del mercurio fueron los primeros antisépticos empleados, y Robert Koch los consideraba como germicidas poderosos. A finales del siglo XIX, se demuestra que los compuestos mercuriales eran sobre todo bacteriostáticos, hallazgo que ha sido ampliamente confirmado, tanto para los compuestos mercuriales inorgánicos como para los orgánicos que se empiezan a utilizar a principios del presente siglo.

Su importancia en la medicina desciende desde mediados de este siglo. Entre las causas de este retroceso están los progresos realizados en la elaboración de diuréticos

no mercuriales , la superioridad reconocida de antisépticos no mercuriales , y la eficacia de pomadas antibacterianas con sustancias sintéticas y antibióticos , campos en los cuales los mercuriales orgánicos e inorgánicos fueron en un tiempo los preferidos. En la actualidad los mercuriales tienen principal importancia en la toxicología, en especial ambiental (80).

El mercurio forma fácilmente enlaces covalentes con el azufre , propiedad que explica la mayor parte de las características biológicas del metal (190,249). Cuando el azufre se encuentra en forma de grupos sulfhidrilos , el mercurio divalente sustituye al hidrógeno para formar mercaptidos, $X-Hg-SR$ y $Hg(SR)_2$; en donde X es el radical electronegativo y

R la proteína . Los compuestos sulfhidrúlicos se denominan mercaptanos por su capacidad para "capturar" el mercurio $[RHg-SR]$. Los mercuriales , aún en bajas concentraciones, tienen la facultad de inactivar las enzimas sulfhidrúlicas y alteran , por lo tanto , el metabolismo y funcionamiento de las células. Este metal se combina también con otros ligandos de importancia fisiológica , como los grupos fosforilo (de la membrana celular) , carboxilo , amido y amino (de las enzimas) . Actualmente todavía se ignora hasta qué punto la combinación con estos grupos puede contribuir a la inhibición de las enzimas , a la precipitación de las proteínas y al efecto corrosivo de los iones mercurio.

Las variadas acciones terapéuticas y tóxicas de los mercuriales están asociadas con los radicales químicos , que afectan la solubilidad , la disociación y la afinidad relati-

va para diversos receptores celulares (249).

El mercurio interfiere con el metabolismo del piruvato en el cerebro , estimula la deficiencia de tiamina, por lo general interactúa con los grupos -SH (del ácido lipídico, de la pantotélna y de la coenzima A) y los grupos S-S de las proteínas. El mercurio inhibe o incrementa la actividad de algunas enzimas (Tabla No. 11).

Tabla No.11 Enzimas afectadas en presencia del mercurio	
Enzima	Procedencia
<u>Incremento de la actividad</u>	
fosfatasa alcalina	hígado y pulmón de rata
B-glucoronidasa	riñón de ratón
N-acetil glucosaminidasa	riñón de ratón
Fosfatasa ácida	pulmón de rata
Lactato deshidrogenasa	cerebro de rata
Glutamato-oxaloacetato transaminasa	orina de rata
Aspartato amino transferasa	orina de rata
<u>Inhibición de la Actividad</u>	
Fosfatasa alcalina	leucocitos de rata
Fosfohidrolasa ácida	riñón de ratón
Glucosa 6-fosfatasa	riñón de ratón
Citocromo c-oxidasa	riñón de ratón
Glutaminasa	cerebro de cerdo
Lactato deshidrogenasa	riñón de rata

El mercurio forma complejos con la cisteína , triptofano , adenosina y guanosina; además interactúa con los nucleótidos , RNA y DNA presentándose cambios en la rotación específica entre adenina-timina y citocina-guanina.

El hidróxido de metil-mercurio desnatura el DNA bacteriano y animal por que reacciona con los grupos imino(-NH) de la timina y guanina. El metil mercurio induce

la síntesis de proteínas e incrementa las subunidades de ribosomas y polirribosomas. Los compuestos del mercurio pueden producir anomalías además de efectos mutagénicos y teratogénicos (195, 224, 229). En el caso de los derivados de fenil y metil mercurio inhiben la mitosis e inducen la formación de extracromosomas. Todos los compuestos orgánicos alteran la estructura del cromosoma (249).

Aún no se comprueba en seres humanos que el consumo de altas concentraciones de mercurio causen aberraciones en los cromosomas, pero 10 ppm de este metal induce la transformación y mitosis de los linfocitos. El mercurio (Hg^{2+}) inicialmente se fija a las globulinas y eritrocitos, después se desplaza a la albumina y se distribuye a los tejidos. En unas cuantas horas el metal puede encontrarse en el riñón, hígado, sangre, médula ósea, bazo, mucosa bucal y respiratoria superior, pared intestinal (colon), piel, glándulas salivares, corazón, músculo esquelético, cerebro y pulmones; también se puede acumular en los huesos. Los compuestos orgánicos del mercurio como el metil mercurio (contaminantes ambientales de mayor importancia), son liposolubles y se absorben rápidamente, casi completamente por el aparato gastrointestinal y en la sangre, en donde aproximadamente el 90 % de estos compuestos se introducen en los eritrocitos (80, 224, 269).

En la actualidad el mercurio y sus derivados son un riesgo ambiental y agrícola, además de ser un problema médico patente, ya que una intoxicación por este metal puede ser

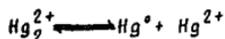
mortal (82,83). El interés por el estudio de la contaminación con mercurio surge después del descubrimiento de elevadas concentraciones de metil-mercurio en algas y pescados procedentes de la Bahía de Minamata y Niigata en Japón , que ocasionaron la muerte de 46 personas , en los cuales se encuentran cantidades de 30 a 50 mil veces mayores que el nivel máximo tolerable.

Los fertilizantes y catalizadores en la producción de cloruro de vinilo son importantes fuentes de contaminación. Una de las causas de la disminución de pájaros en Suecia es el uso del acetato de fenil-mercurio y metil-mercurio, que frecuentemente , se utilizan como fungicidas (126,180,214, 238,249).

El metil-mercurio incorporado por desechos industriales a la cadena alimentaria acuática y también introducido accidentalmente en los alimentos a partir de los cereales tratados con fungicidas , puede causar una intoxicación crónica en la que el sistema nervioso central es particularmente afectado , con alteraciones de conducta , depresión , irritabilidad , insomnio , temblor intestinal , fatiga , somnolencia , retardo mental en niños , ocasionalmente alucinaciones y muerte (80,180,181).

4.1.1 Ciclo del Mercurio en la Biosfera .

En el medio ambiente el mercurio se encuentra en tres estados :mercurio metálico(Hg^0), iones mercúrico(Hg^{2+}), iones mercurosos(Hg^+), los cuales se encuentran en equilibrio químico .



El mercurio se encuentra distribuido en rocas, suelos, aire y agua en forma volátil, adsorbida a las superficies o formando complejos. Algunos minerales como la Livingstonita ($HgSb_4S_7$) contiene de 5 a 100 μg de mercurio por Kg de roca.

En la superficie del agua el mercurio se encuentra generalmente en forma de cloruro mercúrico e hidróxido de mercurio. La concentración de mercurio en agua dulce no contaminada es frecuentemente de 0.1 $\mu g/l$. En el aire las formas más comunes son el mercurio elemental (Hg^0), el metil-mercurio y a veces el dimetil-mercurio. El nivel de mercurio en aire no contaminado es generalmente de 1-10 ppb. Esta distribución varía dependiendo de la concentración de mercurio en suelo, agua y depósitos de minerales, además de la contaminación por aguas de desecho industrial (195,269).

Por su importancia en la contaminación ambiental, el mercurio es el metal pesado más estudiado por los investigadores (113,229,269).

El ciclo del mercurio es de gran importancia en la naturaleza, por lo cual se ha estudiado ampliamente y se conocen las bases bioquímicas y moleculares de sus transformaciones, en las cuales juegan un papel importante los microorganismos (113) (Fig.No. 2).

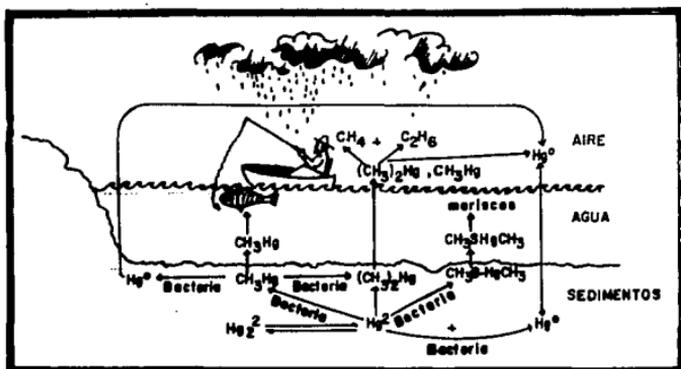


Fig.No. 2 Ciclo del Mercurio en la naturaleza

El ciclo del mercurio consta de varios procesos químicos-biológicos como: Reducción, metilación, reducción, degradación de compuestos orgánicos, y acumulación del metal en plantas y animales (263).

Los iones mercúricos (Hg^{2+}) se encuentran en suelos y rocas en forma de sulfuro mercúrico (HgS). Cuando se desprenden de ellas, se depositan en los sedimentos de ríos y lagos, en donde los microorganismos llevan a cabo su reducción a mercurio elemental (Hg^0) o metilación. El metil-mercurio y dimetil-mercurio pueden ser degradados a compuestos con menor toxicidad como mercurio elemental (Hg^0). El metil-mercurio es 100 veces más tóxico que el mercurio inorgánico. En época de lluvias el metil-mercurio y dimetil-mercurio se disuelven en el agua, en donde se transforma en mercurio elemental (264).

La concentración de mercurio en agua salada es de 0.15 ppb, es decir, los océanos contienen alrededor de

2×10^8 toneladas de mercurio, si se toman en cuenta las diversas industrias que descargan cerca de 12,500 toneladas de mercurio por año (el 20 % de esta cifra en E.U.A), sin contar las industrias del petróleo que por año descargan de 10,000-60,000 toneladas/año , se estima que en total se descargan al año $2 \times 10^4 - 7 \times 10^4$ toneladas de mercurio tanto en la atmósfera como en el agua (195,263).

En la naturaleza existen microorganismos capaces de transformar los compuestos mercuriales en formas menos tóxicas , ayudando de esta manera a la desintoxicación del medio ambiente. En la Fig.No. 3 se presenta en forma esquemática la biotransformación del mercurio en el medio ambiente.

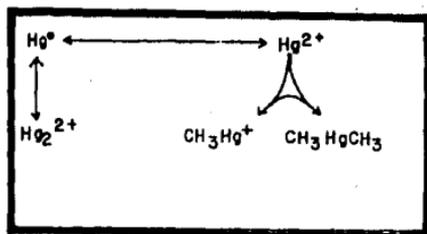


Fig.No. 3 Biotransformación del Mercurio.

4.1.2 Reducción de Compuestos Inorgánicos del Mercurio

Algunos de los microorganismos aerobios o facultativos, tienen la capacidad de reducir nico (Hg^{2+}) a mercurio elemental, a través de un mecanismo que se induce en presencia de estos compuestos (49, 230, 263). Estas bacterias utilizan el mecanismo para eliminar del medio ambiente, compuestos tóxicos, como el cloruro mercúrico (107). Hace algunos años, Tonomura y Kenzaki aíslan del suelo una cepa de Pseudomonas sp. resistente al cloruro mercúrico y observan su capacidad para degradar iones mercúricos. Más tarde Smith reporta una cepa de Escherichia coli con múltiple resistencia a antibióticos y simultáneamente resistente al cloruro mercúrico (215, 241). En la actualidad se tienen evidencias de que Staphylococcus aureus y Enterobacter aerogenes, también pueden llevar acabo dicha transformación (49, 74, 107, 125, 126).

Recientemente, Izaki aísla del suelo una cepa de Bacillus cereus resistente al cloruro mercúrico y demuestra que el microorganismo es capaz de reducir los iones mercúrico y mercuriosos en mercurio elemental (Hg^0). Para este propósito el investigador inocula a la bacteria en caldo nutritivo con diferentes concentraciones de $HgCl_2$ e incuba a una temperatura de $30^{\circ}C$ con agitación, para medir posteriormente la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a 660 nm (Fig. No.

4).

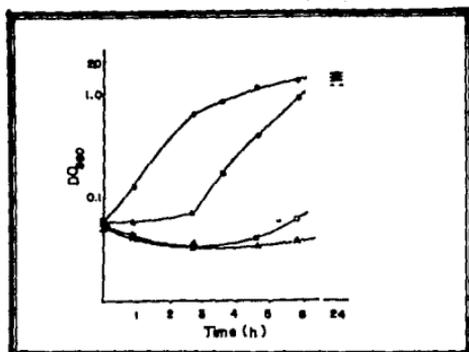


Fig.No. 4 Efecto de $HgCl_2$ sobre el crecimiento de Bacillus cereus. \circ , sin $HgCl_2$; \bullet , $10 \mu M$ de $HgCl_2$; \square , $20 \mu M$ de $HgCl_2$; Δ , $50 \mu M$ de $HgCl_2$.

En la gráfica anterior se observa que Bacillus cereus es resistente al cloruro mercúrico. En presencia de elevadas concentraciones ($50 \mu M$) de este compuesto la fase "lag" de crecimiento es prolongada y el crecimiento es más lento. Cuando las células se desarrollan previamente en presencia de $HgCl_2$ ($10 \mu M$) y posteriormente se inoculan en caldo nutritivo a diferentes concentraciones de cloruro mercúrico, se observa que la fase "lag" de crecimiento es menor, mientras que la velocidad de crecimiento aumenta (Fig. No. 5) (107).

Para demostrar la reducción del cloruro mercúrico a mercurio elemental, Izaki inocula Bacillus cereus (previo crecimiento en $HgCl_2$) en caldo nutritivo con cloruro mercúrico radioactivo ($^{203}HgCl_2$, $10 \mu M$) y determina su disminución en el medio de cultivo. Durante el estudio se observa que

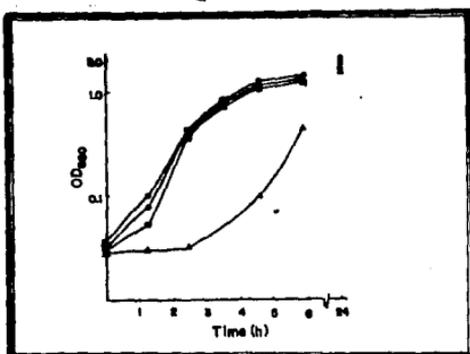


Fig.No. 5 Efecto de $HgCl_2$ sobre el crecimiento de Bacillus cereus (previo crecimiento en $10 \mu M$ de $HgCl_2$).
 o , sin $HgCl_2$; • , $10 \mu M$ de $HgCl_2$; □ , $20 \mu M$ de $HgCl_2$; △ , $50 \mu M$ de $HgCl_2$.

la velocidad de crecimiento es inversamente proporcional a la radioactividad presente (Fig.No. 6).

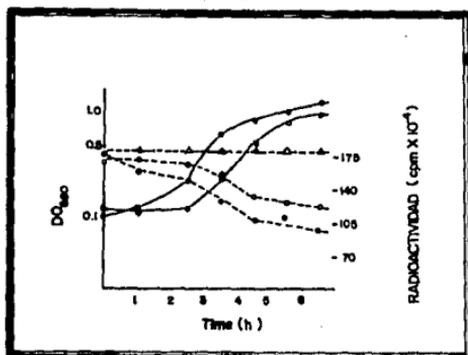


Fig.No. 6 Reducción de $HgCl_2$ a mercurio elemental por Bacillus cereus. Las líneas continuas indican crecimiento del microorganismo, , previo desarrollo en $10 \mu M$ de $HgCl_2$; ● , en ausencia del compuesto. La línea discontinua señala la radioactividad en el medio de cultivo; o , en ausencia de células.

Los resultados demuestran que después de 6 horas de incubación, la disminución de la radioactividad del medio es alrededor de 45% cuando las células se desarrollan previamente en HgCl_2 (10 μM).

Posteriormente Kōmura e Izaki utilizan un método para capturar el mercurio elemental (Hg^{203}) de microorganismos resistentes al HgCl_2 . Las células (80 mg/peso seco), se lavan y resuspenden en 50 ml de un medio que contiene: glucosa, cloruro de sodio, solución amortiguadora de fosfatos y cloruro mercúrico marcado ($^{203}\text{HgCl}_2$, 0.002 mM), posteriormente se incuba a 37°C durante 140 minutos. El recipiente se conecta a una serie de tubos de 30 ml de volumen, los cuales contienen 10 ml de agua regia cada uno, en donde se captura el mercurio elemental radioactivo. Durante los estudios, se demuestra que al aumentar el crecimiento bacteriano, disminuye el cloruro mercúrico marcado y aumenta el mercurio elemental (Hg^{203}). Estos resultados comprueban uno de los mecanismos sugeridos para la transformación del HgCl_2 en mercurio elemental (Hg^0) (107,126).

Microorganismos como: Escherichia coli, Pseudomonas sp., Streptomyces sp., Thiobacillus ferrooxidans, y Mycobacterium scrofulaceum, son capaces de realizar dicha transformación (195). Los mismos efectos se observan cuando se trabaja con extractos de Escherichia coli. Cuando los extractos celulares se incuban en presencia de $^{203}\text{HgCl}_2$, disminuye la radioactividad y se detecta la presencia de mercurio elemental radioactivo, lo que demuestra la presencia de una enzima que realiza dicha transformación, a la que recientemente se le denomina "Mercurio Reductasa".

La enzima mencionada se aísla primeramente de Pseudomonas sp. K61 (75) y recientemente de Bacillus cereus (107), Thiobacillus ferroxidans (181) , Escherichia coli (181) , Corynebacterium sp. , Rhodopseudomonas sp. , y Moraxela sp. (107, 126, 195) .

Muy recientemente , Fox y Walsh purifican y caracterizan a la enzima responsable de la reducción del Hg^{2+} a mercurio metálico (74, 209, 236). Para la purificación de la enzima los investigadores inoculan Pseudomonas aeruginosa PA09501 en caldo Luria con extracto de levadura (10 g/l) , cloruro de sodio (10 g/l) , glucosa (1g/l) , y se incuba a una temperatura de 32°C (hasta que el crecimiento sea de una densidad de 300-400 unidades Klett). Las células se resuspenden en 25 ml de una solución amortiguadora compuesta por: fosfato de sodio (20 mM, pH 7.5) , EDTA (0.5 mM) y 2-mercapto-etanol (0.1 %) , a una temperatura de 4°C . Posteriormente se rompen las células a una presión de 12,000 p.s.i. , seguida de una centrifugación a 27,000 X g durante 30 minutos , el sobrenadante se decanta y se agrega la misma cantidad de solución amortiguadora inicial. El extracto celular se incuba a una temperatura de 65°C durante 30 minutos y se centrifuga a 12,000Xg durante 15 minutos para remover las proteínas precipitadas. El sobrenadante obtenido se pasa por una columna de gel (Matrex A naranja , 2.5X20 cm) a una velocidad de 0.4ml/min. La columna se lava con la solución amortiguadora mencionada anteriormente a una velocidad de 1.0ml/min. La enzima mercurio reductasa se eluye con la solución amortiguadora suplementada con NADPH (100 μ M).

Izaki determina: el peso molecular de la enzima (165,000), el pH y temperatura óptima para la actividad enzimática (pH= 6.6-6.8 , T=70°C), así como el efecto de algunas sustancias químicas . El investigador observa , que la actividad enzimática se inhibe en presencia de Ag^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Cu^+ , ditiotreitól, N-Etilmaleinada, Iodoacetamida, y se estimula en presencia de 2-mercaptoetanol (Tabla No. 12) (193).

Tabla No. 12 Compuestos que inhiben la actividad enzimática de la enzima Mercurio Reductasa .

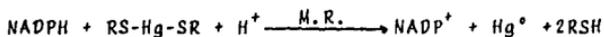
Compuestos	Concentración (M)	Inhibición(%)
$AuCl_3$	10^{-5}	58.1
	10^{-4}	81.4
$AgNO_3$	10^{-5}	67.3
	10^{-4}	98.3
Cloruros de: Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} ,	10^{-5}	15.0
Cu^{2+} , La^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} .	10^{-6}	40.0
Pb^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+}		
Acetato fenilmercurico	10^{-5}	4.2
	10^{-4}	34.0
p-Hidroximercuribenzoato	10^{-5}	24.0
	10^{-4}	31.0
Ditiotreitól	10^{-5}	19.0
	10^{-4}	60.0
m-Clorocarbonil cianuro	10^{-5}	27.0
Fenilhidrazona (CCCP)	10^{-4}	50.0
KCN	10^{-2}	54.0
	10^{-3}	0.0

Estudios realizados con la enzima mercurio reductasa aislada de distintos microorganismos : Thiobacillus ferrooxidans , Pseudomonas sp. , Bacillus cereus , Pseudomonas aeruginosa y Escherichia coli, indican que para la actividad enzimática

es esencial la presencia de NADPH y compuestos sulfhidrúlicos como el 2-mercaptoetanol, tioglicolato y cisteína. Algunos autores señalan que en ausencia de compuestos sulfhidrúlicos no se lleva a cabo la reducción de los iones mercurícos (33, 74, 107, 125, 126, 180, 195, 214, 228, 255).

Recientemente Furukawa y Tonomura reportan que algunas especies de Pseudomonas y Escherichia coli requieren del Citocromo c como cofactor para llevar a cabo la transformación mencionada (113, 208, 236). Jernelov indica que los electrones del NADPH, se transfieren al citocromo c vía mercurio reductasa y el mercurio puede ser el aceptor final de electrones (195).

Para que se lleve a cabo la reducción del mercurio se requiere, a parte de NADPH, de un exceso de grupos tioles. La presencia de estos grupos sugiere que el ión Hg^{2+} , se encuentra formando mercaptidos (RS-Hg-SR), los cuales reaccionan con la enzima formando mercurio elemental y $NADP^+$, de acuerdo a la siguiente reacción :



Barbara Fox indica que la enzima, es capaz de aceptar hasta 4 electrones durante su actividad (74).

Summers y Sugarman señalan que en Escherichia coli, la enzima mercurio reductasa se localiza en el citoplasma, además su actividad depende de la temperatura, concentración de Hg^{2+} , de la presencia de glucosa 6-fosfato y glucosa 6-fosfato

deshidrogenasa así como de compuestos sulfhidrúlicos (195,229).

Esta enzima es importante en la transformación de compuestos organomercuriales como el cloruro de metilmercurio , acetato mercurico y el timerosal (70,255).

La habilidad de los microorganismos para reducir el Hg^{2+} a Hg^0 se relaciona con la presencia de los plásmidos pJJ1, pRN1, p851, pRR13, pR831, y el transposon Tn501 que promueven resistencia al mercurio (74,125,126,180 193,230,255). Recientemente T.J.Fox demuestra la existencia de 2 tipos de mercurio reductasa , una codificada por plásmidos (como pR100) y la otra por el transposon Tn501. Ambas enzimas difieren en peso molecular (74,255). Ann Summers y Elaine Lewis encuentran que en Escherichia coli , Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa , los plásmidos : U150, U305, U480, R-AsKCTsuM, p1258-mer14, p1258-mer, FP⁺ y p518, codifican la síntesis de la enzima mercurio reductasa (193,195,227).

Estudios genéticos , indican que las enzimas mercurio reductasa de Pseudomonas sp. (Tn105), glutatión reductasa de los eritrocitos humanos y lipoamida deshidrogenasa de Escherichia coli presentan sitios activos semejantes (23,129 195,257) (Fig.No. 7).

Mercurio Reductasa Tn105
THR ILE GLI GLI THR CIS VAL ASN VAL GLI CIS VAL PRO SER LIS

Glutati6n Reductasa
LEU GLI GLI THR CIS VAL ASN VAL GLY CIS VAL PRO LIS

Lipoamida Deshidrogenasa
THR LEU GLI GLI VAL CIS LEU ASN VAL GLI CIS ILE PRO SER LIS

Fig.No. 7 Secuencia de amino6cidos de los sitios activos de las enzimas Mercurio Reductasa de Pseudomonas sp., Glutati6n Reductasa de los eritrocitos humanos y Lipoamida Deshidrogenasa de Escherichia coli.

En la figura anterior se observa que la enzima mercurio reductasa de Tn105 consta de una secuencia de 15 amino6cidos y el sitio activo es similar en las 3 enzimas, por esta raz6n algunos investigadores indican que la enzima mercurio reductasa procede de alguna enzima del metabolismo normal (224).

4.1.3 Oxidaci6n del Mercurio

Diversos investigadores se6alan que la oxidaci6n del mercurio no se lleva acabo por microorganismos , ya que no existen evidencias , ni se han aislado microorganismos capaces de realizar dicha transformaci6n (214,224,229).

Halbach y Clarkson demuestran que bajo ciertas condiciones bioqu6micas y enzim6ticas los eritrocitos humanos oxidan el mercurio elemental . Cuando la concentraci6n de mercurio es elevada , los eritrocitos incorporan el metal , el cual comienza a ser oxidado. La oxidaci6n del mercurio depende

de la generación de H_2O_2 y la presencia de las enzimas Catalasa (Hidrogenoperoxidasa, oxidoreductasa, EC1.11.1.6) y Glutatión peroxidasa (Hidrogenoperoxidasa; oxidoreductasa, EC 1.11.1.9.).

Estudios realizados con eritrocitos humanos de ratones y de patos, indican que el transporte de mercurio depende de la concentración de H_2O_2 . En la Fig. No. 8 se presentan los resultados obtenidos del estudio.

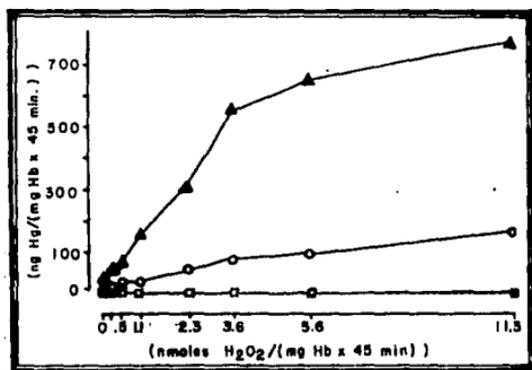


Fig. No. 8 Transporte de Mercurio en eritrocitos humanos (▲), de ratón (○), y de pato (◻).

En la gráfica anterior se observa que al incrementarse la cantidad de H_2O_2 generado, el transporte de mercurio en el eritrocito aumenta.

En general, la oxidación del mercurio en los eritrocitos depende de la concentración de H_2O_2 , cambios en la permeabilidad del eritrocito y la presencia de inhibidores enzimáticos.

Halbach y Clarkson señalan que aún no se sabe cuál es el mecanismo y las bases bioquímicas de esta transformación, pero sugieren que la oxidación del mercurio encierra reacciones intracelulares con el peróxido de hidrógeno [84] .

4.1.4 Metilación del mercurio inorgánico (Hg^{2+})

El cloruro mercuríco que se encuentra en el medio ambiente se solubiliza en el agua en forma de sulfuro mercuríco (HgS), para que posteriormente sea reducido o bien se lleve acabo su metilación [116, 117, 263] .

La metilación del Hg^{2+} es de gran importancia, debido a que el metil y etilmercurio son los compuestos más tóxicos, en comparación con otros derivados del mercurio y se acumulan en animales, peces y plantas de importancia económica, además causan intoxicaciones al hombre. Cuando el metil-mercurio se acumula, es eficientemente retenido (como se explica al inicio de este capítulo) y su excreción es lenta. Aparentemente la metilación del mercurio se lleva acabo en animales y en el hombre [249] . Edwards y McBride detectan elevadas concentraciones de metil-mercurio-cisteína en excremento de personas expuestas a cloruro mercuríco, o bien que ingieren alimentos contaminados con el metal (Minamata, Japón, Alamo gordo, Nuevo México, Coatzacoalcos e Irán), lo que indica que la microflora del intestino del hombre puede llevar acabo esta transformación [9, 58, 66, 69, 195, 269] .

Algunos microorganismos ,poseen la capacidad de transformar los iones Hg^{2+} a metil-mercurio y dimetil-mercurio como un mecanismo de desintoxicación ,como en el caso de Neurospora crassa,Clostridium cochlearium y Escherichia coli. Esta transformación depende de: la concentración de iones Hg^{2+} , de la población microbiana , el pH, la temperatura , el potencial de oxido-reducción , los efectos de sinergismo o antagonismo de los procesos metabólicos y la concentración de sulfidos en el medio(113,195,263,264).

Hamdy y Noyes aislan de sedimentos del río Savannah , Gorgia ,microorganismos resistentes al cloruro mercúrico (1,200 g de Hg^{2+}) y logran identificar diferentes géneros bacterianos , entre los que se encuentran:Enterobacter sp.,Enterobacter aerogenes ,Streptococcus sp.,Escherichia coli, y Staphylococcus sp.. Durante estos estudios se observa que Enterobacter aerogenes es capaz de incorporar iones Hg^{2+} radioactivo y transformarlo a metil-mercurio . Para su demostración los investigadores inoculan a la bacteria en caldo glucosado con sales basales (GBSB) y pH 7.0 que contiene por litro de agua destilada y desionizada: KH_2PO_4 (68 g), $CaCl_2$ (0.09 g), $HgSO_4$ (0.06 g), $MnSO_4$ (0.001 g), $ZnSO_4$ (0.007 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.025 g), NH_4Cl (0.25 g) , $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.001 g) y glucosa (10g) suplementado con $Hg(NO_3)_2$ (0.50 $\mu g/ml$ de medio), se incubaba a una temperatura de 37°C durante 3 días. El cultivo bacteriano se encuentra conectado a una serie de trampas ; la primera contiene 200 ml de una solución compuesta por Na_2CO_3 al 5%- Na_2HPO_4 al 5%, la segunda está compuesta por 200 ml de una solución de H_2SO_4 (1 N), di-

tiozona al 0.005% y KBr al 10% ; la última contiene 200 ml de una solución formada por KNO_3 al 5% y H_2SO_4 (2 N). La función de las trampas es atrapar el metil-mercurio, etil-mercurio y mercurio volátil (Hg^0). La concentración del mercurio y compuestos orgánicos del mercurio presentes en las trampas se determinan por medio de cromatografía de rayo LASSER, cromatografía gas-líquido y espectrofotometría de absorción atómica (86).

Cuando termina el tiempo de incubación del cultivo bacteriano, se centrifuga a $12,000\times G$ durante 10 minutos. Las células se lavan con solución salina y se rompen por sonicación (50-60 Kc, 3-5 min), se ajusta el volumen a 20 ml con HCl (2 N), posteriormente se realizan dos extracciones con 50 ml de Benceno y se centrifuga a $12,000\times G$ durante 10 min. La fase orgánica se trata de manera similar.

Al sobrenadante inicial (medio de cultivo libre de células) se le añade solución salina y ácido clorhídrico (2 N, pH 1.0), se extrae con benceno al 50 % (v/v) y se centrifuga a $12,000\times G$ durante 10 min. A la fase orgánica se le añade una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.005 M, v/v), se centrifuga a una velocidad de 400 rpm durante 15 min. A la fase acuosa obtenida se le añade una solución de KBr y H_2SO_4 (pH 1), se centrifuga y se adiciona benceno (50%, v/v) para después volver a centrifugar (400 rpm, 15 min). La fase orgánica extraída se evapora y el residuo (10-20 ml) se utiliza para determinar la concentración de metil-mercurio y mercurio por cromatografía gas-líquido c de rayo LASSER.

Durante el estudio se observa , la disminución de Hg^{2+} en el medio de cultivo y se detecta la presencia de metil-mercurio en las trampas , células y medios de cultivo, lo que indica que Enterobacter aerogenes utiliza el nitrato mercúrico para la síntesis del metil-mercurio. La capacidad para metilar los iones mercurio también se demuestra en los siguientes géneros bacterianos : Metanobacterium sp. , Pseudomonas fluorescens , Clostridium sp. , Clostridium cochlearium y Bacillus megaterium (112, 195, 214, 229).

Diversos investigadores han observado que la metilación del mercurio se afecta por factores como : la concentración de mercurio inorgánico, el tiempo de incubación , la presencia de oxígeno, de DL-Homocisteína o metil-cobalamina (5, 6-dimetilbencimidazolil cobalamina , CH_3-B_{12}) (195, 229, 230).

Jensen demuestra el efecto de la concentración de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) en la producción de metil-mercurio , utilizando sedimentos del lago de Langsjön, Estocolmo , a los cuales añade diferentes concentraciones de Hg^{2+} e incuba a $24^{\circ}C$ durante 7 días para posteriormente detectar por medio de fotometría de masas o cromatografía gas-líquida, la presencia de metil-mercurio. Durante el estudio se observa , que al incrementar la concentración de Hg^{2+} en los sedimentos , aumenta la producción de metil-mercurio (Fig.No. 9).

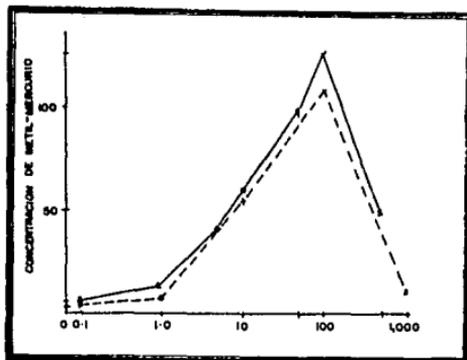


Fig.No.7 Efecto de la concentración de los iones Hg^{2+} , en la producción de metil-mercurio

En la figura anterior se observa que la producción de metil-mercurio depende de la concentración de cloruro mercúrico presente en el medio. Otro factor que influye en la síntesis de metil-mercurio es el tiempo de incubación. Se observa que al aumentar el tiempo de incubación se incrementa la producción del derivado metilado (Fig. No. 10).

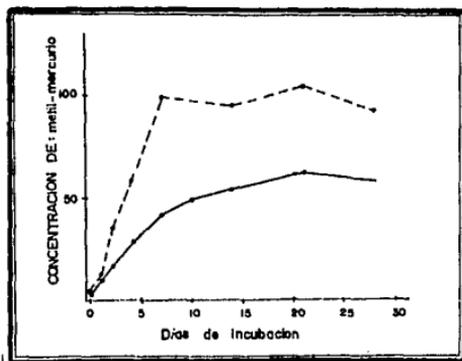


Fig.No.10 Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de metil-mercurio. La línea continua indica la conc. Hg^{2+} 10 ppm, línea discontinua 100 ppm.

La gráfica anterior demuestra que la síntesis de metil-mercurio es mayor cuando la concentración de los iones mercúricos (Hg^{2+}) es de 100ppm, en comparación con una concentración de 10 ppm (112).

Durante un estudio realizado con Enterobacter aerogenes, Hamdy y Noyes, determinan que en condiciones aeróbicas, se estimula más la producción de metil-mercurio, que en condiciones de anaerobiosis y en presencia de DL-Homocisteína (0.25 mol/ml) decrece la síntesis del compuesto orgánico. En la Tabla No. 13 se presentan los resultados del estudio.

Tabla No. 13 Efecto de DL-Homocisteína en condiciones aeróbicas y anaeróbicas sobre la producción de metil-mercurio por <u>Enterobacter aerogenes</u> .				
Tiempo de incubación	Sistema de crecimiento	Producción de Metil-mercurio		
		extracto celular	celulas	cultivo
3	Aerobio	321.5	184.9	431.9
10		14.5	11.8	26.2
20		45.5	134.1	179.6
3	Aerobio*	246.5	29.8	351.3
10		26.8	45.9	72.7
20		102.0	ND	102.0
3	Anaerobio	149.2	243.6	392.8
10		0	0	0
20		28.0	100.2	128.2

*Medio GBSB suplementado con DL_Homocisteína (0.25 mol/ml).

Los datos de la tabla anterior indican que la producción de metil-mercurio se lleva a cabo tanto en condiciones aeróbicas como en anaeróbicas. En condiciones aeróbicas,

se favorece la producción de metil-mercurio y la misma decrece en presencia de DL-Homocisteína .

Algunos autores han observado que la producción de metil-mercurio disminuye en presencia de aminoácidos, proteínas, peptona , glutatión , ácido sulfhídrico y se incrementa en presencia de metilcobalamina y cisteína(113,195).

Diversos investigadores indican que la metilación se lleva a cabo , debido a la transferencia de grupos metilos (112,263,264). Estudios recientes señalan la posibilidad de que 3 coenzimas puedan llevar a cabo esta transformación:

1. S-Adenosilmetionina
2. N⁵-metiltetrahydrofolato, y
3. Metilcobalamina.

Las primeras 2 coenzimas no son capaces de transferir grupos metilos a los iones Hg^{2+} , por que ambas transfieren el grupo metilo como CH_3^+ . La metilcobalamina es el único agente capaz de transferir grupos metilos a los iones Hg^{2+} en forma de carbanión (112,195,263).

Hace algunos años J.H.Wood postula un mecanismo de metilación de los iones Hg^{2+} utilizando como donador de grupos metilos a la metilcobalamina ,ATP, y la enzima metilcobalamina sintetasa; el mecanismo requiere de condiciones anaeróbicas (Fig. No. 11) (263,264).

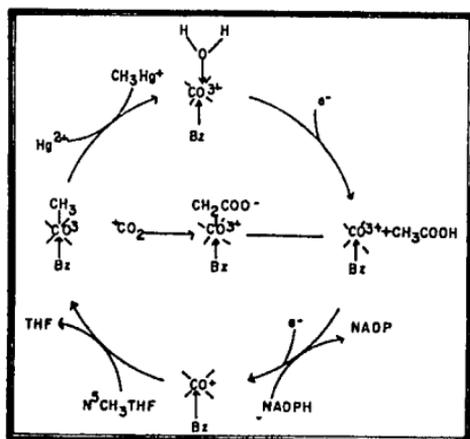


Fig.No. 11 Mecanismo de Metilación del mercurio vía metilcobalamina sintetasa , en condiciones anaerobicas.
^aB_z = 5,6-dimetilbencimidazolil cobalamina.

Posteriormente Wood , señala, que en condiciones aeróbicas , el mecanismo de metilación es diferente , debido a que los microorganismos no requieren la enzima metil cobalamina sintetasa para llevar acabo la transformación ,aunque si requiere la presencia de metilcobalamina[Fig.No. 12] [264].

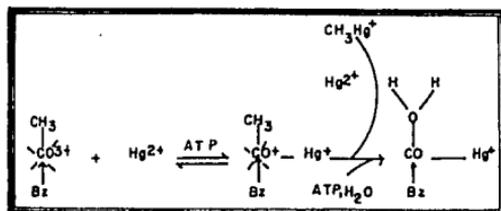
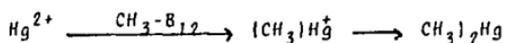
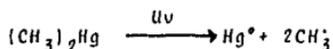


Fig.No.12 Mecanismo de metilación del mercurio en condiciones aeróbicas .

El metil-mercurio producido en condiciones aeróbicas como en anaeróbicas, reacciona inmediatamente con los iones Hg^{2+} para formar dimetilmercurio, de manera similar a la producción de metil-mercurio. Se ha observado que la síntesis



de dimetil-mercurio es 6000 veces más lenta que la del metil-mercurio y el pH óptimo es de 4.5. El dimetil-mercurio es un compuesto volátil, una vez que se encuentra en la atmósfera es fotolizado por los rayos ultravioleta obteniéndose mercurio inorgánico (Hg^0) y radicales metílicos, los cuales reaccionan con el hidrógeno para formar metano y etano (263).



En sus estudios Summers y Silver señalan, que las bacterias y levaduras que habitan en sedimentos, aguas residuales y suelos, poseen la habilidad para utilizar la metilcobalamina, como donador de grupos metilos. En el caso de las bacterias que forman la flora habitual en el hombre y animales (peces), se piensa que el mecanismo es diferente, debido a que Escherichia coli utiliza a la metionina como donador de grupos metilos, la cual se encuentra en las células (195).

La metilación del mercurio también se realiza abióticamente pero se requiere de metabolitos microbianos y luz ultravioleta. La metilación fotoquímica se realiza en aguas saladas.

Estudios cinéticos señalan que:

- a) el producto predominante de la metilación en sistemas acuáticos es el metil-mercurio,
- b) el rango de metilación es elevado en sistemas anaeróbicos, y
- c) la metilación se inhibe en presencia de sulfitos en algunos sistemas aeróbicos (113).

4.1.5 Transformación de compuestos orgánicos del mercurio

Los compuestos orgánicos del mercurio frecuentemente se encuentran contaminando suelos, plantas y agua debido a que se utilizan abundantemente en la agricultura como insecticidas, fungicidas, herbicidas y pesticidas (51, 195). Gran proporción de estos compuestos son transformados por microorganismos a compuestos volátiles con menor toxicidad (49, 209, 255). Esta transformación es de importancia en la medicina debido a que bacterias patógenas como Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Serratia marcescens, y Staphylococcus aureus poseen la capacidad de degradar algunos organomercuriales utilizados como desinfectantes (49, 54, 209). En la figura No. 13 se presentan las estructuras de algunos compuestos orgánicos del mercurio que pueden ser transformados por microorganismos (41).

La capacidad para transformar organomercuriales como el fenil-mercurio, metil-mercurio y etil-mercurio, se observa en microorganismos como Escherichia coli. Summers y Sugarman inoculan esta bacteria en caldo triptona suplementado con cloruro de sodio (5g/l) y cloruro de metil-mercurio (10^{-3})

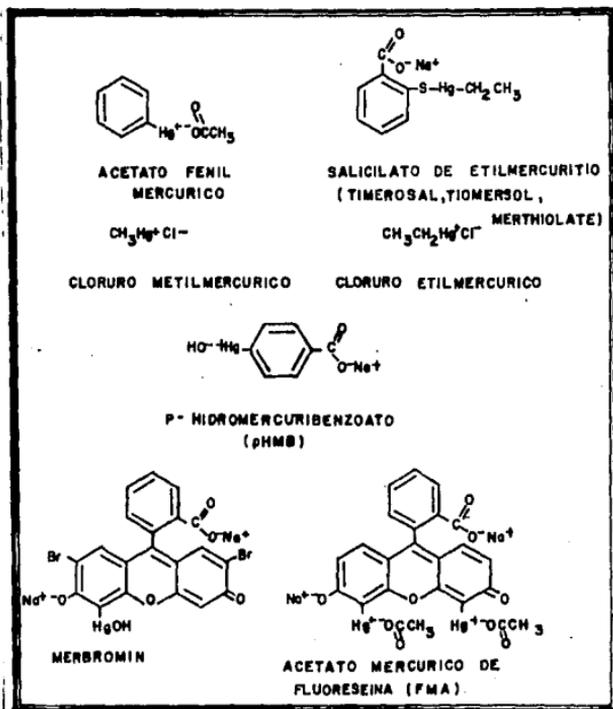


Fig.No.13 Estructuras de algunos Organomercuriales.

o acetato de fenil-mercurio (Hg^{203}) radioactivo e incuban a una temperatura de 37°C durante 3 a 4 horas. En estas condiciones, los investigadores observan que disminuye la concentración del compuesto orgánico en el medio de cultivo y por espectrofotometría de absorción atómica, se detecta la presencia de mercurio (Hg^0) y benceno.

Esta habilidad de transformar los compuestos orgánicos derivados del mercurio también se demuestra en

Penicillium roqueforti, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas sp. K62, Klebsiella aerogenes y Staphylococcus aureus (195, 209, 228, 240, 255 263). En todos los medios de cultivo en los cuales se desarrollan los microorganismos antes mencionados, se detecta la presencia de compuestos orgánicos como : benceno, metano y etano, además de mercurio (214, 240).

Diversos investigadores demuestran que los microorganismos resistentes a compuestos como el cloruro de metilmercurio, acetato fenil-mercúrico y cloruro de etil-mercurio, sintetizan 2 enzimas diferentes. Una de las enzimas es la Mercurio Reductasa y la otra es la Organomercurio hidrolasa; capaz de romper los enlaces carbono-mercurio presentes en estos compuestos (34, 41, 69, 195, 229, 240, 241). A continuación se presenta un ejemplo de dicha transformación.



Para la obtención de la enzima Organomercurio hidrolasa, Tezuka y Tonomura, utilizan una cepa de Pseudomonas sp. K62, que inoculan en caldo triptona suplementado con cloruro de sodio (5 g/l) e incuban a una temperatura de 37°C durante 24 horas en condiciones aerobias. Después de la incubación, las células (5% g peso seco) se suspenden en solución amortiguadora Tris (50 mM, pH 7.4) suplementada con EDTA (0.5 mM), ditiotreitól (0.1 mM) y glicerol (10%), posteriormente se centrifuga para volver a resuspender en la misma solución amortigua-

dora ; las células se rompen a una presión de 300 a 400 Kg/cm². Al extracto celular se añade 3 g de estreptomycin, se centrifuga y el sobrenadante se precipita con sulfato de amonio al 70%. El precipitado obtenido se resuspende en solución amortiguadora. La enzima se purifica por filtración en gel seguida de una cromatografía en DEAE-Celulosa y electroforesis en Poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio. Posteriormente los investigadores determinan por filtración en gel, el peso molecular de la enzima (17,000 - 20,000) y finalmente se observa el efecto de la temperatura, pH y algunas sustancias químicas sobre su actividad. El pH óptimo para que se lleve a cabo la actividad enzimática es de 5 y se mantiene estable hasta pH 11, en lo que respecta a la temperatura, la óptima es de 40°C y arriba de 55°C la enzima se inactiva.

El efecto de algunas sustancias sobre la actividad enzimática se determina por un método espectrofotométrico que mide la cantidad de ²⁰³Hg^o formado cuando se encuentra ausente algún compuesto químico de importancia para la reacción. Para el ensayo se añade en tubos solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4, 50mM), acetato fenil-mercúrico radioactivo (1.0

M) o cloruro de metil-mercurio y se omite alguna de las siguientes sustancias: EDTA (5mM), acetato de magnesio (0.2 mM), 2, mercaptoetanol o cisteína, albúmina de suero bovino (0.5 mg), mercurio reductasa purificada y NADPH (200 M). La mezcla de reacción se incuba a 30°C durante 40 min., posteriormente se adiciona cloruro estañoso al 10 % (10 M) para detener la reacción y se mide la concentración de mercurio elemental formado (²⁰³Hg^o). Una unidad enzimática se define como: la concentración de enzima

que hidroliza 1mmol de ion mercúrico (Hg^{2+}) presente en los compuestos orgánicos usados como sustratos (Tabla No.14).

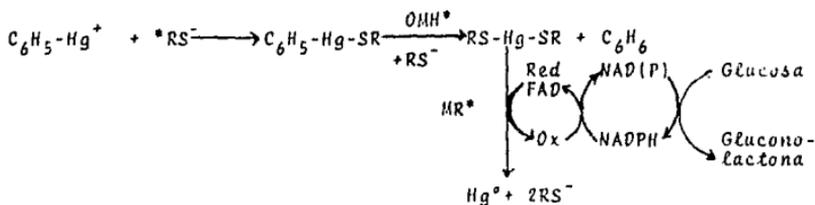
Tabla No. 14 Efecto de algunas sustancias químicas sobre la actividad de la enzima Organomercurio hidrolasa		
Compuesto omitido	Actividad Enzimática (%)	
	Cloruro de metilmercurio	Acetato fenilmercurico
-	100	100
Acetato de magnesio	100	100
Albúmina de suero bovino	34	21
NADPH	6	10
Mercurio reductasa	13	15
L-Cisteína	6	2
EDTA	6	2

Los resultados mostrados en la tabla anterior indican que la actividad de la enzima depende de la presencia de EDTA, compuestos sulfhidrilicos, NADPH y de la enzima mercurio reductasa. La enzima requiere de una alta concentración de proteínas, ya que cuando se omite la albúmina de suero bovino, la actividad enzimática decrece de 80 a 65%.

Tezuka y Tonomura indican que ciertas sustancias como la azida de sodio (NaN_3) y el cianuro de potasio no influyen en la actividad enzimática, en cambio el ácido monoiodo acético y monoiodo acetamida inhiben totalmente su actividad (236).

Los microorganismos resistentes a los compuestos orgánicos, sintetizan las enzimas organomercurio hidrolasa para romper los enlaces C-Hg y la mercurio reductasa para reducir los iones mercúrico que se producen durante la reacción

(69). Charrabarti señala que esta transformación requiere de grupos sulfhidrilos y postula el siguiente mecanismo para el cual, los microorganismos llevan a cabo la degradación de los derivados organomercuriales (34, 49, 214, 224).



- * OMH Organomercurio hidrolasa
- MR Mercurio reductasa
- RS Grupos sulfhidrilos

Estudios genéticos indican que la resistencia de los microorganismos a los compuestos orgánicos del mercurio, así como su habilidad para degradarlos y convertirlos a compuestos con menor toxicidad es conferida por plásmidos, que contienen la región "Mer" (228, 229). Recientemente Schoitel aísla de *Escherichia coli* J53-1 que hospeda al plásmido R381 la enzima organomercurio hidrolasa, que es similar a la de *Pseudomonas sp.* y *Staphylococcus aureus* (255). En *Pseudomonas aeruginosa*, esta capacidad se encuentra asociada al factor de sexo (Pili F) (228).

4.1.6 Plásmidos que Codifican Resistencia al Mercurio y sus derivados

La resistencia de los microorganismos al mercurio y sus derivados orgánicos, así como la transforma-

ción del metal vía microbiana, ha sido estudiada por muchos investigadores, en lugares donde existe una elevada contaminación por este metal entre los que se encuentran Suecia y Japón (141, 195).

Recientemente Robinson encuentra que el agua de desecho doméstico así como el agua de desecho industrial y de hospitales contienen elevadas concentraciones de metales pesados, y aisla de ellas microorganismos resistentes a elevadas concentraciones de mercurio. Esta resistencia se codifica por medio de plásmidos, los cuales determinan entre otras características resistencia a antibióticos y otros metales pesados (173, 195). En microorganismos aislados de hospitales, la frecuencia de resistencia al mercurio es elevada (alrededor de 60%), debido a que dicha resistencia se transfiere entre las bacterias por medio de conjugación (157, 173, 189, 220, 229). Algunos investigadores indican que en hospitales la frecuencia de resistencia a metales pesados es tan alta como la resistencia a antibióticos (156, 157, 158, 173).

En el hospital de Hammersmith, Londres, se realiza un estudio con 800 plásmidos (Hg^R), que se transfieren de un huésped común Escherichia coli K-12 a diferentes géneros bacterianos como: Proteus sp., Salmonella sp., Serratia sp., Shigella sp., y Klebsiella sp.. Durante el estudio, se encuentra que la frecuencia de resistencia al mercurio es del 25%. En Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus la frecuencia de plásmidos que confieren resistencia al mercurio es elevada, de 787 cepas

clínicas de Ps. aeruginosa , el 99.8% es resistente a este metal, de las cuales el 99.5% exhibe múltiple resistencia a metales y sólo el 53.2 % presenta múltiple resistencia a antibióticos (82, 83, 156, 158, 220).

Estudios realizados por F.D. Porter y colaboradores en el hospital de St. Louis, Mo., con Escherichia coli y Staphylococcus aureus , indican que durante el período de 1972 a 1977, la resistencia de Escherichia coli al mercurio es del 57% y disminuye un 29% de 1977 a 1982. En Staphylococcus aureus la frecuencia de resistencia hasta 1977 es de 36% y disminuye un 10% , de 1979 a 1982 . La disminución en la frecuencia de resistencia , se debe a la reducción de compuestos mercuriales usados como diuréticos y desinfectantes en este hospital (83, 189).

La frecuencia de los plásmidos que codifican resistencia a metales , también se estudia en aguas residuales de hospitales , y de industrias ; especialmente las que producen películas fotográficas , en las cuales existe una gran cantidad de microorganismos que hospedan por lo menos un plásmido que codifica resistencia al mercurio. Informes bibliográficos indican que en aguas residuales de los hospitales se aísla con mayor frecuencia Klebsiella pneumoniae (85%) y en aguas residuales de industrias Citrobacter freundii (80%). En algunos casos , también se aísla Bacillus subtilis , Bacillus sp. , Chlamydomonas reinhardi y Vibrio sp. , todos ellos resistentes a elevadas concentraciones de mercurio (141, 195, 238).

Los plásmidos bacterianos muestran un número menor de resistencia a compuestos orgánicos de mercurio. En

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Escherichia coli, cerca del 96% de los plásmidos que codifican resistencia al mercurio también controlan resistencia al Merbromín y al Acetato mercúrico de fluoresceína pero no a otros organomercuriales. El otro 4% adicional, determina resistencia al Acetato de fenil-mercurio (importante en la agricultura) y Timerosal (usado como antiséptico). Todos los plásmidos de Pseudomonas aeruginosa controlan resistencia al p-Hidroximercuribenzoato y algunos muestran resistencia adicional al Metil-mercurio y Etil-mercurio. Los plásmidos de Staphylococcus aureus difieren de los de bacterias Gram negativos, ya que controlan resistencia al Acetato de fenil-mercurio, p-Hidroximercuribenzoato, Acetato mercurio de fluoresceína, pero no al Timerosal y Merbromín (218, 228).

Diversos investigadores clasifican los plásmidos que codifican resistencia al mercurio y sus derivados en 2 tipos:

- a) De Espectro Reducido. Plásmidos en los que la resistencia involucra la reducción de los iones mercúricos (Hg^{2+}) a mercurio metálico (Hg^0) (expresión de la enzima Mercurio reductasa) y promueven resistencia a algunos organomercuriales, incluyendo el Merbromín y el Acetato mercúrico de fluoresceína.
- b) De Espectro Amplio. Plásmidos que promueven resistencia a todos los compuestos inorgánicos del mercurio además determina resistencia a los organomercuriales incluyendo Acetato fenil-mercurio y Metil-mercurio por medio de su biotransformación, es decir, se expresan las enzimas Mercurio reductasa y Organomercu-

rio hidrolasa [70,71,224]. Este espectro esta restringido a un número muy pequeño de plásmidos de los grupos de incompatibilidad :A-C,L y H₂[72,195 251]. [Fig.No. 14].

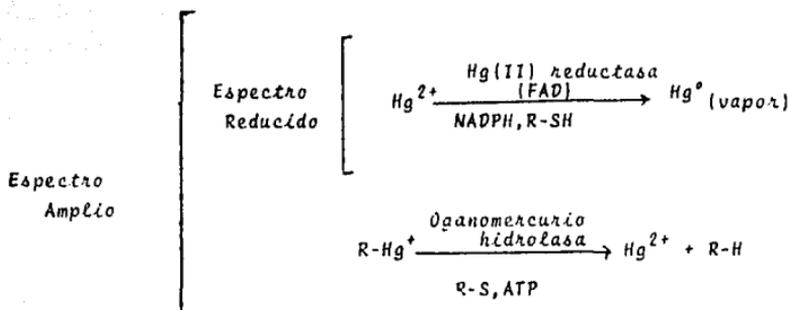


Fig.No.14 Representación Esquemática de las reacciones codificadas por plásmidos de Espectro amplio y Espectro reducido.

La expresión de los plásmidos difiere en cada uno de sus huéspedes, aún cuando sea de la misma familia bacteriana. Algunos informes indican que la expresión de los plásmidos de Escherichia coli difiere totalmente en Pseudomonas aeruginosa y con mayor razón en bacterias Gram positivas [219].

Las enterobacterias que poseen plásmidos de Espectro reducido tienen la habilidad de reducir el Hg²⁺, además de resistir elevadas concentraciones de Merbromin y Acetato mercúrico de fluoresceína, debido a un cambio en la permeabilidad de la membrana celular ;cuando hospedan plásmidos de Espectro amplio promueven la degradación del Timerosal ,p-Hidroxi-mercuri-benzoato (pHMB) ,Metil-mercurio y Etil-mercurio .Todos los plásmidos de Staphylococcus aureus son de amplio espectro de resisten-

y la confieren al p-Hidroxibenzoato y Acetato mercúrico de fluoresceína, además de promover la hidrólisis del timerosal y la reducción de los iones Hg^{2+} .

De los plásmidos que confieren resistencia a metales pesados, los más estudiados son los que expresan resistencia al mercurio. Estos plásmidos se dividen en 3 clases:

- a) Aquellos que poseen factor de sexo como FP_2 y FP_5 ,
- b) Los que codifican resistencia a otros metales y antibióticos como R902, R26, R3108, pMG1, pMG2 y pMG5,
- c) Aquellos que confieren solamente resistencia al mercurio y derivados como $Hg-h$ y MER(33).

En la Tabla No.15 se presenta una lista de los plásmidos que codifican resistencia al mercurio y sus derivados.

Plásmidos	Fenotipo	Bacteria hospedadora	Ref.
R15	SmSuSpSuHg	<u>Pseudomonas sp.</u>	218
R26	CbTcNmKmSmSuGmHgPma	-	92
R28	SmSpTcHgPma	-	92
R38	SmSuTcHgrPmrTer	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
R40a	ApCbCpKmSu	<u>Ps. aeruginosa</u>	95
R55-1	CmSuHgr	-	34
R52	SmSpTcHgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	95
R57b	ApCbCmGmKmSuHgr	<u>K. pneumoniae</u>	209
R93-1	HgrPma	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
R100	Hgr	<u>Escherichia coli</u>	159
R100-1	HgrCmSmTc	<u>Escherichia coli</u>	71
R192	CmTcHgr	-	95
R39	CmSmSuTcHgrPmrTer	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
R68	CbCmGmKmSmTcHgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
R222	CmSmSuTcHgr	<u>Escherichia coli</u>	159

Plásmido	Fenotipo	Bacteria hospedadora	Ref.
R828	PmaApCbCmGmKmSmTcHgr	<u>Serratia marcescens</u>	209
R830a	KmSmTcHgrPma	<u>Serratia marcescens</u>	209
R832	ApCbKmtcHgrPma	<u>S. marcescens</u>	209
R312	CmSmSpHg	<u>S. marcescens</u>	209
R348F	CmKmSpTcHgr	<u>S. marcescens</u>	209
R401	ApCbSmHgr	<u>Proteus rettgeri</u>	209
R455	ApCmCbSmSuTcHgr	<u>Proteus morgani</u>	209
R700	SuHgr	<u>Providencia sp.</u>	209
R725	HgrCmSmSuTc	<u>Shigella dysenteriae</u>	209
R754	ApCmCpSmSuHgr	<u>P. mirabilis</u>	209
R938	ApCbCmCpKmSmTcSuHgr	<u>Serratia marcescens</u>	209
R831	TraKmSmHgrPma	<u>Escherichia coli</u>	209
R527	KmSmSuTcHgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
R839	CbCmGmKmSmSuTcHgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
RI033	CbCmGmKmSmSuTcHgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
R3108	SmSuTcHgr	<u>Pseudomonas sp.</u>	34
RP1-69	CbKmtcHgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-70	HgrApCbCpKmTc	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-71	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-72	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-72	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-73	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-74	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-75	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-76	CbHgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-77	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-78	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-79	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-81	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-82	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-83	HgrTc	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-84	HgrTc	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
RP1-85	HgrKm	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
pRR-130	ApColE ₁ Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	159
pRR132	Hgr	-	34
pRR134	Hgr	-	34
RGN823	HgrSt	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	93
R471	ApCbCpTcHgrPma	<u>S. marcescens</u>	209
R473	ApCbCpHgrPma	<u>S. marcescens</u>	209
R-Ask	CtApSuSmKmCmSuTcHgr	<u>Escherichia coli</u>	-
U480	SmSpApSuHgr	<u>Escherichia coli</u>	-
U365	TcSmCmHgr	<u>Escherichia coli</u>	-
pRR150	ApSmSuTcHgr	<u>Proteus mirabilis</u>	159
pRR12	Hgr	<u>Proteus mirabilis</u>	159
RPL11	CmCbSmTcGmHgrPmaTc	<u>Pseudomonas sp.</u>	34
JS524	Hgr		34
JS556	Hgr		34
JS561	Hgr		34
Hg-z	Hgr	<u>Pseudomonas sp.</u>	34
MER	Hgr	<u>Pseudomonas sp.</u>	41
FP2	Hgr	<u>Pseudomonas sp.</u>	41

Plásmido	Fenotipo	Bacteria hospedadora	Ref.
pVS1	HgrSuPma	<u>Ps. aeruginosa</u>	219
pVS2	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	218
pV71	Hgr		
pI258	HgrPmaPen401Cad52	<u>Staphylococcus aureus</u>	172
pI524	Hgr	<u>Staphylococcus aureus</u>	172
pI1258-me ₂	HgrPenCd	<u>Staphylococcus aureus</u>	172
pMG1	GmSmSuHgrPmaUv	<u>Pseudomonas sp.</u>	34
pMG2	GmSmSuHgrPma	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
pMG5	GmCmKmsmSuTmHgrTet	<u>Pseudomonas sp.</u>	34
pDU202	CmSmSuHgr	<u>Escherichia coli</u>	75
pDU989	TrHgr	<u>Escherichia coli</u>	72
pDU982	TcHgr	<u>Escherichia coli</u>	163
pDU1003	TcHgr	<u>Escherichia coli</u>	163
pDU1214	TcHgr	<u>Escherichia coli</u>	163
pDU1215	TcHgrTp	<u>Escherichia coli</u>	163
pDU1125	CmHgr	<u>Escherichia coli</u>	163
pDU3330	ApSuSpCEHgr	<u>Escherichia coli</u>	163
pUB307::Tn501	KmTcHgr	<u>Escherichia coli</u>	
pUB7	Hgr		
pUB404	CbNmKmhgrTc	<u>Ps. aeruginosa</u>	10
pUB410	CbNmKmhgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	10
pUB781	HgrColE1	<u>Escherichia coli</u>	10
VR1	HgrTcSmTmCmSp	<u>Ps. aeruginosa</u>	159
IR211	ApCbCmGmKmsmSuPmaHgr	<u>Klebsiella aerogenes</u>	209
248BHPc			
ColE1::Tn501	HgrColE1	<u>Escherichia coli</u>	109
pUB5203	ProMetNalHgr	<u>Escherichia coli</u>	
pJP4	HgrPma	<u>Alcaligenes entrophus</u>	51
pCS229	HgrSpSuAp	<u>Proteus mirabilis</u>	265
pSIF305	TcHgr	<u>Escherichia coli</u>	23
pVW22	Hgr	<u>Escherichia coli</u>	251
pBR322	Hgr		
pHH1	Hgr	<u>Ps. aeruginosa</u>	34
pR	Hgr	<u>Escherichia coli</u> W2252	
RTFJ11	Hgr	<u>Escherichia coli</u> AB1932-1	
RN987	Hgr	<u>Staphylococcus aureus</u>	215
PU21	Hgr	<u>Escherichia coli</u>	
JJ1	SpScCmSuHgr	<u>Escherichia coli</u>	227
UI50	TcSpApSuHgr	<u>Escherichia coli</u>	
pS18	Hgr	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	
pU71	Hgr	<u>Staphylococcus aureus</u>	172
JR72	CbCmKmsmSpTcHgr	<u>Serratia marcescens</u>	48
RH28	ApCbCmCpTcHgr	<u>Serratia marcescens</u>	48
Rcp135	HgrAPCbGmSmSuTc	<u>Serratia marcescens</u>	
U305	CmSmTcHgr		228
RN180	HgrPmaApCbKmsu	<u>Providencia sp.</u>	
RN181	HgrPmaApCbCmCpKmsuTc	<u>Providencia sp.</u>	
RN182	HgrCmSmSu	<u>Salmonella paratyphi</u>	
RN184	HgrApCbCmCpSmSu	<u>Salmonella sp.</u>	
DG21	HgrCpSmTc		
DG35	HgrApCbCmKmsTc		
DG36	HgrApCbCmKmsTc		

Plásmido	Fenotipo	Bacteria hospedadora	Ref.
PS18	Hgr	<u>Ps.aeruginosa</u>	224
B36	HgrApCmCbSmTc		
J71	HgrApCbCmKmSmTc	<u>Escherichia coli</u>	
J82	HgrApCbCpTc		
BU9990	HgrSmTc		
RP4-RDL11	GmCmSuHgrTerUv	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
pMG6	CmGmKmSmSuTmHgrTerCa	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
Rms159	CmSmTcHgrPmaTer	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
pM67	GmKmSuTmHgr	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
Rcp64	CbGmCmSuTmHgr	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
R716	SmHgr	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
pMG18	CbGmKmSmSuHgr	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
R3108	SmSuTcHgrPmaTer	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
R471a	ApCbCpTcHgr	<u>Serratia marcescens</u>	209
R3108	Hgr	<u>Ps.aeruginosa</u>	225
pDU	Hgr	<u>Escherichia coli</u>	23
pDB7	Hgr	<u>Escherichia coli</u>	251
pSM1	CmKaTcApTpSuHgrPma		42
p11147	Hgr	<u>Staphylococcus aureus</u>	172
NR1	HgrSuSmFuCmTc	<u>Escherichia coli</u>	193
pRR130	HgrPma	<u>Escherichia coli</u>	193
U305	TcSp CmHgr	<u>Escherichia coli</u>	226
U480	SpStApSuHgr	<u>Escherichia coli</u>	226
R-ASKCTSuMK	ApSpKcCmTeSuMe	<u>Escherichia coli</u>	226
pRR106	ApHgrPma	<u>Escherichia coli</u>	148

Diversos investigadores indican que la resistencia al mercurio como a algunos antibióticos se transfiere de un plásmido a otro plásmido o de un plásmido al genoma bacteriano por medio de transposones. A este proceso se le llama transposición de segmentos de DNA. En la Tabla No 16 se presenta una lista de los transposones que codifican resistencia al mercurio, caracterizados por diferentes investigadores (12,14,195).

Tabla No.16 Transposones que Codifican Resistencia al Mercurio y sus derivados,

Transposones	Kb	Plásmido	Fenótipo	Bacteria hospedadora	Referencia
Tn2603	20.0	R100	Hgr	<i>E. coli</i>	195
Tn 501	8.2	pVS1	HgrSu	<i>Ps. aeruginosa</i>	10
Tn2613	7.2	pCS229	Hgr	<i>P. mirabilis</i>	232
Tn2608	13.5	RGN823	HgrSmSu	<i>K. pneumoniae</i>	232
Tn21	19.0	R100	HgrSmSu	<i>E. coli</i>	232
Tn2603	20.0	RGN238	SmSuApHgr	<i>K. pneumoniae</i>	265
TnA	-	R100-1	HgrAp	-	95
Tn3401	-	RP1	Hgr	<i>Ps. fluorescens</i>	191
Tn3402	-	RP1	HgrPma	<i>Citrobacter sp.</i>	171
Tn3403	-	RP1	HgrPma	<i>Klebsiella sp.</i>	191
Tn801	-	pDU202	Hgr	<i>E. coli</i>	72
Tn5	-	R100	Hgr	<i>E. coli</i>	163
Tn1861	-	pVS1	HgrSu	<i>Ps. putida</i>	195
Tn502	-	-	Hgr	<i>Pseudomonas sp.</i>	195
Tn2670	-	-	Hgr	<i>Pseudomonas sp.</i>	195
Tn2671	-	-	Hgr	<i>Pseudomonas sp.</i>	195
Tn551	5.2	-	HgrSn	<i>S. aureus</i>	195
Tn26131	-	pCS229	SpSuHgr	<i>S. aureus</i>	195

Entre los transposones que codifican resistencia al mercurio (Hgr) los más estudiados son: Tn501 (10,23, 74 75,195 ,) , Tn21 (74,107,193,214, 220,232) y Tn801 (71, 75,220 232), los cuales codifican resistencia de espectro reducido , además promueven la síntesis de la enzima Mercurio reductasa y el sistema de transporte de iones mercurio (Hg^{2+}) que es inducido por la presencia de compuestos mercuriales . El plásmido R831b codifica resistencia de amplio espectro, pertenece al grupo de incompatibilidad M y promueve la síntesis de la enzima Organomercurio hidrolasa . A.L. Radford indica que este plásmido posee un transposon que codifica resistencia al Acetato fenil-mercúrico (PMA) (191).

La naturaleza y organización de los genes que codifican la resistencia al mercurio se estudian extensamente en el plásmido R100 de *Escherichia coli* y algunos plásmidos de

Staphylococcus aureus; en ambos sistemas la resistencia al ión mercúrico y compuestos organomercuriales es determinada por un operón, que es inducible en presencia de dichos compuestos (224,228).

Por patrones de restricción, mapeo genético por delección, secuenciación de DNA y técnicas de mutagénesis transposicional del plásmido R100, se sabe que la resistencia al mercurio es gobernada por un operón (mer), que consiste en una serie de genes, que se encuentran en el siguiente orden: merR, codifica la síntesis de una proteína regulatoria, responsable de la inducibilidad del sistema; posteriormente se encuentra la secuencia del operador/promotor así como el sitio donde se inicia la síntesis del RNA; merT, es el gene que gobierna el transporte de iones Hg^{2+} , es decir, responsable de la síntesis de una proteína de membrana que interviene en el transporte de Hg^{2+} al interior de la célula y su movilización a los sitios de desintoxicación; merC, un nuevo gene del cual aún no se sabe su función; merA que codifica la síntesis de la enzima Mercurio Reductasa, y merD. En algunos plásmidos y transposones que confieren resistencia de amplio espectro se encuentra el gene merB, que codifica la síntesis de la enzima Organomercurio hidrolasa (72,109,159,214,224). La localización de los genes mencionados anteriormente se presentan en la Fig.No.15 y la estructura del operón en la Fig.No.16

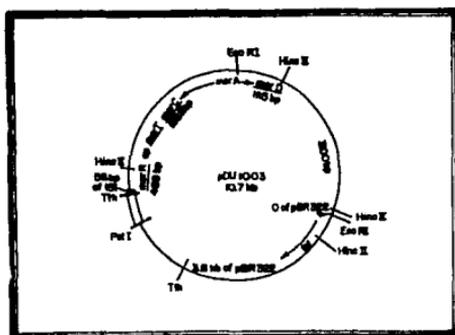


Fig.No. 15 Mapa genético del operón *mer* del plásmido R100 clonado en un pequeño vector del plásmido pBR322. *EcoRI*, *HincII*, *PstI* y *TthI* representan los sitios de ruptura del DNA al ser tratado con las enzimas de restricción.

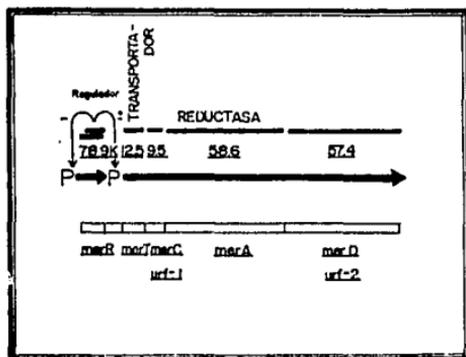


Fig.No. 16 Mapa genético del operón *mer* del plásmido R100.

En la Fig.No. 15 se presenta el mapa genético del plásmido R100 clonado en un pequeño vector que es el plásmido pBR322. En la Fig.No. 16 se muestra el mapa genético del operón mer del plásmido R100 que codifica resistencia de espectro reducido (251,261). Las funciones del gene merC y merD aún no se conocen!

Estudios genéticos realizados con los transposones Tn21 y Tn501, indican la existencia del gene merP que codifica la síntesis de las proteínas asociadas a la membrana, que ayudan al transporte de iones Hg^{2+} (130,224) (Fig.No. 17).

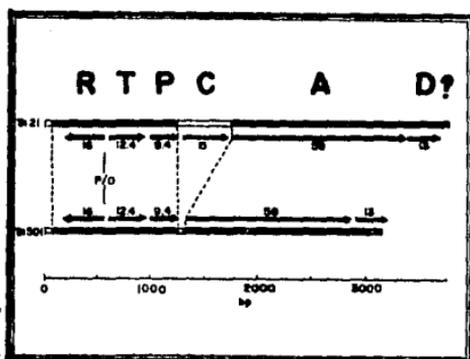


Fig.No. 17 Esquema del Operón mer de los transposones Tn21 y Tn 501.

En la figura anterior se muestra el mapa genético del operón mer en los transposones Tn21 y Tn501. Los análisis de secuenciación del DNA demuestran que el operón de ambos transposones es semejante y solamente difiere en el

gene merC (10,232).

De las regiones genéticas que conforman al operón mer, las más estudiadas son los genes merA y merB. El gene merA codifica la síntesis de la enzima mercurio reductasa; en el transposón Tn21, esta región está formada por 564 nucleótidos y en el Tn501 de 561. El gene merB que codifica la síntesis de la enzima Organomercurio hidrolasa, solo está presente en plásmidos que codifican resistencia de espectro amplio. Hasta ahora, se sabe poco acerca de la estructura y función del gene merB, además de su localización en el operón (224). Estudios realizados con diferentes plásmidos y transposones, indican que la secuencia del operón mer es muy semejante, aún cuando el plásmido o transposón provenga de bacterias diferentes (214, 224).

La resistencia al mercurio únicamente se expresa después de la exposición a niveles subtóxicos de mercurio (Hg^{2+}) u organomercuriales, induciéndose la síntesis de la enzima mercurio reductasa, la hipersensibilidad al mercurio y el transporte de mercurio a través de la membrana (69, 70, 71, 159, 195, 225). La hipersensibilidad a los compuestos mercuriales como la capacidad del microorganismos para ligar al mercurio y su transporte a través de la membrana se codifica por el gene merT. El gene merR es responsable de la regulación de la función del gene merT cuando existe una inducción, llevándose a cabo el transporte de iones Hg^{2+} , la síntesis de la enzima mercurio reductasa y la hipersensibilidad al Hg^{2+} y organomercuriales (71, 109, 160).

El gene merR regula la expresión de los genes estructurales del operón mer en forma positiva (en presencia de Hg^{2+}) y negativa , es decir, en presencia o ausencia del represor . Algunos estudios demuestran, que en ausencia de mercurio (Hg^{2+}) la expresión de los genes del operón mer se reprimen, solo en presencia del mercurio (10^{-6} , 10^{-8} M) se observa la expresión del operón .Ciertos investigadores señalan que el gene merR puede reprimir al gene merT (177,224).

Estudios genéticos realizados por Misra y Silver con el plásmido R100(Shigella sp.) y el transposón Tn105 (Pseudomonas sp.) indican que la secuencia de aminoácidos de los que esta formado el producto del gene merR es muy semejante (80%). En la Fig.No.18 se presenta la secuencia de aminoácidos del producto del gene merR del plásmido R100 y el transposón Tn501(23,161,163).

Tn501	MET	ARG	ALA	ARG	SER	ALA	ILE	PHE	SER	ARG
pR100
Tn501	THR	SER	LEU	SER	LEU	CIS	SER	ALA	ARG	LEU
pR100
Tn501	LEU	ALA	SER	SER	GLN	TRP	VAL	PRO	SER	SER
pR100
Tn501	SER	SRG	SER	SER	SER	ALA	ILE	SER	SER	ARG
pR100	.	.	ASN
Tn501	LEU	LIS	PRO	SER	ARG	TRP	ALA	ASP	PHE	THR
pR100	.	ASN	.	.	.	CIS
Tn501	LIS	ARG	THR	ARG	VAL	THR	SER	ALA	SER	PRO
pR100	ASN	PHE	.	.	THR

Fig.No. 18 Secuencia de aminoácidos del producto del gene merR del plásmido R100 y el transposón Tn501.

La secuencia de aminoácidos del producto del gene merR perteneciente al plásmido R100 y al transposón Tn105, es muy semejante y solo difiere en 6 aminoácidos, como se puede observar en la figura anterior.

Algunos estudios realizados con el transposón Tn105, señalan que la transcripción del material genético inicia en el gene merR y prosige con los genes merTPCAD, que se encuentran separados por 72 pares de bases. La región que regula al operón mer (gene merR) es relativamente pequeña comparada con la de otros operones, como ara (177). Entre el punto de iniciación de la transcripción y los genes merTPCAD se encuentran 2 regiones que funcionan como sitios operadores (224).

El punto en que termina la transcripción del material genético no ha sido mapeada, pero algunos autores señalan que el gene merD puede ser el punto final de la transcripción.

La resistencia a los compuestos del mercurio también es codificada por plásmidos de bacterias Gram positivas (128, 225). La resistencia al mercurio asociada con la enzima mercurio reductasa frecuentemente se encuentra en plásmidos y en el genoma de bacterias aisladas de hospitales, tales como : Staphylococcus aureus, Bacillus spp., Streptomyces sp., Mycobacterium sp., y Clostridium sp. (33, 130, 192, 224, 255, 261).

Estudios realizados con el plásmido p1258 de Staphylococcus aureus, indican que el operón mer está formado por 3 genes : merA, merB y merR. Estos genes poseen la misma función en las bacterias Gram positivas como en la Gram

negativas , su regulación , mecanismo eszimático y el transporte de los iones a través de la membrana es similar , aunque no se encuentren los genes T, D y P (41, 195). Algunos investigadores señalan que los genes *merA* y *merB* se empiezan a transcribir por diferentes operadores y su regulación también es diferente (69, 131, 195, 224).

4.1.7 Mecanismos de Resistencia de Los Microorganismos al mercurio y sus derivados.

El mercurio inicialmente interactúa con la célula difundiendo a través de los poros de la membrana celular . El espacio periplásmico se encuentra cargado negativamente debido a la presencia de los oligosacáridos que secuestran a los iones Hg^{2+} formando mercáptidos. El mercurio tiene un rápido efecto sobre la membrana celular ; en los microorganismos resistentes disminuye rápidamente la permeabilidad de la membrana y se induce la actividad del operón *mer* (195, 224) sintetizándose 4 proteínas periplásmicas (12Kd , 14 Kd, 15 Kd, 66Kd) que disminuyen el transporte y penetrabilidad de los iones Hg^{2+} al interior de la célula (86, 108, 109, 127, 128, 224), además de la enzima mercurio reductasa codificada por el gene *merA* . La enzima recibe los iones Hg^{2+} directamente de las proteínas que lo transportan para llevar a cabo su reducción a mercurio elemental que de manera similar se transporta al exterior de la célula cuidando que no se oxide en el citoplasma (Fig. No. 19)

Durante la transformación de los iones Hg^{2+} a mercurio elemental se requiere de electrones que se obtienen del NADPH .

El mercurio es transportado a través de la membrana citoplásmica por traslocación de grupos o difusión facilitada. En la Fig.No. 19 se presenta en forma esquemática la desintoxicación de los microorganismos resistentes al mercurio, vía mercurio reductasa.

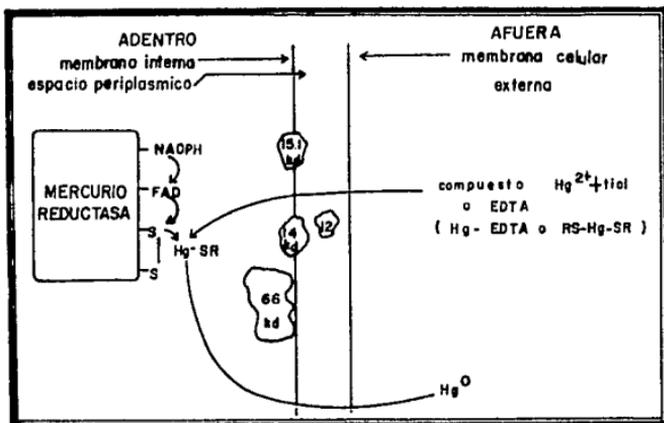


Fig.No. 19 Mecanismo de Reducción de los iones Hg^{2+}

Cuando el microorganismo es resistente a compuestos organomercuriales, el gene merB codifica la síntesis de la enzima Organomercurio hidrolasa que rompe los enlaces C-Hg de los compuestos orgánicos, desprendiéndose Hg^{2+} , que es reducido a Hg^0 por la enzima Mercurio reductasa (255). La reducción de los compuestos inorgánicos del mercurio como la degradación de los compuestos orgánicos y la metilación del mercurio, son mecanismos de resistencia y de desintoxicación de los microorganismos y del medio ambiente (41, 224, 226, 255).

El estudio del operón mer contribuye a la investigación sobre el control de la contaminación por este metal vía microbiana en lagos , ríos lagunas , mares y suelos (41,68,70,72,127,156,195,224,227,255).

4.2 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL CADMIO.

Aunque el Cadmio es un elemento raro en la naturaleza, y su concentración es mucho menor que la del Mercurio y plomo, se encuentra en pequeñas concentraciones en el agua, plantas y animales (5).

En diversas industrias el cadmio es uno de los metales que se utiliza con mayor frecuencia, y como consecuencia de los malos mecanismos de seguridad, es uno de los principales contaminantes de ciudades, aguas residuales, lagos y ríos (25, 97, 178). En los tejidos de personas que trabajan en minas y fábricas, se encuentran elevadas conc. de Cadmio acumulado (141). La inhalación e ingestión de compuestos derivados del cadmio, causan anemia e intoxicación en el hombre (110). El metal se acumula en los alveolos pulmonares, que en cantidades importantes provoca la muerte (27).

El Cadmio forma complejos con aminoácidos y péptidos, interacciona fuertemente con los grupos tioles de las proteínas formando "Metaloproteínas" (97). Al igual que otros metales puede sustituir al zinc, necesario para la actividad de la enzima Fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*, es capaz de inactivar una gran cantidad de enzimas (249) (Tabla No. 17).

El cadmio en una concentración de $5 \times 10^{-6} M$ desacopla la fosforilación oxidativa asociada a la oxidación del succinato o citrato en hígado de rata in vivo e in vitro, estimula el transporte de Magnesio (Mg^{2+}) y potasio (K^+) (dependiente de energía) en la mitocondria de las células del corazón, interac-

túa con el fosfato alterando su acumulación y metabolismo

(155,253).

Tabla No.17 Enzimas que se inhiben en presencia de Cadmio.	
Enzima	Procedencia
Fosfatasa ácida	Hígado de perro
Trifosfatasa de adenosina	Músculo de conejo
Aldolasa	Músculo de conejo
Alcohol dehidrogenasa	Hígado de caballo
Fosfatasa alcalina	Hígado de rata y <u>E. coli</u>
-ala sintetasa	Hígado aviar
Amilasa	Bacterias
Aril sulfatasa	Hígado de buey
Anhidrasa carbónica	Eritrocitos humanos
Carboxipeptidasa A (peptidasa)	Pancreas bovino
Carboxipeptidasa B (peptidasa)	Pancreas porcino
Catalasa	Hígado aviar
Colinesterasa	Hígado de rata
Citocromo oxidasa	Hígado de rata (mitocondria)
B Fructofuranosidasa	Levaduras
Glucano deshidrogenasa	Riñón porcino
Trasaminasa glutámico-oxalodéctico	Hígado de rata
Lucosa 5-fosfato deshidrogenasa	Hígado de rata
Glicero fosfato deshidrogenasa	Músculo de conejo
Glicerol glicina dipeptidasa	Pescado
Isocitrato liasa	Levaduras
Leucina aminopeptidasa	Riñón porcino
Lipasa	Pancreas porcino
Lipamida deshidrogenasa	Corazón porcino
Peptidasa	Tiroides bovina
Fosforibonucleasa	Espinaca
Plásmina	Suero humano
Proteinasa	Bacterias
Deshidrogenasa succinica	Hígado de rata
Xantina deshidrogenasa	Hígado aviar
Prolidasa	Riñón porcino

Los resultados de algunos experimentos, indican que en Escherichia coli el cadmio, actúa a nivel de ácidos nucleicos, afecta la conformación y cambia las propiedades físicas del DNA, RNA_x, RNA_n e inhibe síntesis de proteínas (103,149,150,249). Respecto a los virus,

el acetato de cadmio inhibe fuertemente su infectividad , lo que se comprueba con el virus del Mosaico del Tabaco (249).

La toxicidad al cadmio se reduce en presencia de Hierro (Fe^{2+}), Manganeseo y Zinc. Estudios realizados con Klebsiella aerogenes indican que el citrato también reduce la toxicidad de este metal , pero se observa que en Pseudomonas sp. estimula su transporte (130).

La contaminación por cadmio en el medio ambiente , es cada vez mayor , lo cual ocasiona serios problemas para los animales , vegetales y seres humanos , además de propiciar el desarrollo de microorganismos resistentes a éste metal .

Frecuentemente se aíslan microorganismos resistentes al cadmio de aguas contaminadas por este metal y es común encontrar esta resistencia tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas . Recientemente Mahler y col. realizan estudios en una reserva de animales en Boston , donde el agua y el suelo se encuentran contaminados por Cadmio . Para aislar microorganismos resistentes a este metal , los investigadores , inoculan muestras de agua y suelo en agar LB suplementado con cloruro de sodio (20 M). Durante estos estudios se encuentra una gran incidencia de bacterias resistentes al cadmio (70 - 98 %) , de estos microorganismos el 25 % son esporulados. Entre las bacterias identificadas se encuentran : Bacillus subtilis, Pseudomonas putida , Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Bacillus thuringiensis, Bacillus cereus, Lactobacillus plantarum, Bacillus sp. y Staphylococcus aureus.

4.2.1 Metilación del Cadmio.

El cadmio al igual que el plomo, y el estaño, es tóxico en estado catiónico y como el mercurio, tiende a ser más tóxico cuando se metila. Los primeros estudios realizados sobre la contaminación por cadmio indican que, no puede ser metilado debido a que sus compuestos orgánicos no son estables en sistemas acuosos, en los cuales se lleva a cabo dicha transformación. Recientemente C.W.Huey aisla de la Bahía de Chesapeake una cepa de Pseudomonas sp. capaz de metilar el cadmio en presencia de metilcobalamina como donador de grupos metilos. La metilación del cadmio por este género bacteriano aún se encuentra en estudios (229).

4.2.2 Plásmidos que codifican resistencia al cadmio.

La resistencia de los microorganismos al cadmio se confiere por medio de genes cromosómicos y plásmidos, de cepas como Staphylococcus aureus (40, 216) y recientemente de Pseudomonas putida (103.) y Bacillus cereus (141) (Tabla No. 18).

Tabla No. 18 Plásmidos que confieren resistencia al Cadmio.		
Plásmido	Grupo de incompatibilidad	Bacteria portadora
pGU100	-	<u>Pseudomonas putida</u> <u>Bacillus cereus</u>
pBC16	-	
pPI258	Inc.1	<u>Staphylococcus aureus</u>
pPI524	Inc.1	
pPII147	Inc.2	
pU71	Inc.7	
pRN2014	-	
pIII7810	Inc.	

En la tabla anterior se muestran los plásmidos que confieren resistencia al cadmio, la mayoría aislados de Staphylococcus aureus (83).

Estudios recientes realizados con los microorganismos que se mencionan anteriormente, indican que los plásmidos no solamente confieren resistencia al cadmio, sino también a otros metales (Zn^{2+} , Hg^{2+}) y antibióticos. Por ejemplo, el plásmido pIII7810 confiere resistencia a la penicilina, cadmio, mercurio, arsénico, plomo y zinc (54). En otro estudio realizado con 787 cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de secreciones clínicas, se demuestra que el 99.8 % de las cepas poseen múltiple resistencia a diferentes metales y además el 53 % son resistentes a antibióticos (Tabla No. 19).

tipo de resistencia	No. de cepas	Porcentaje	Frecuencia de aislamiento (%)
Hg, Cd, As	559	71.0	71.0
Hg, Cd	2	0.3	27.9
Hg, As	196	24.9	
Cd, As	21	2.7	
Cd	2	0.25	0.5
As	2	0.25	

En la tabla anterior se observa que las cepas multiresistentes se aíslan con mayor frecuencia (104, 127, 158).

Estudios realizados con los plásmidos p1524, p1258 y pIII47, utilizando técnicas de análisis de delección, mutación y recombinación, demuestran la presencia de 3 ge-

nes, localizados en distintos sitios del genoma bacteriano y relacionados con la resistencia al cadmio; el gene CadA responsable de elevados niveles de resistencia, CadB codifica para un nivel de resistencia bajo; no se relaciona con el gene CadA, y Had que promueve la disminución de la resistencia al cadmio (Fig.No. 20) { 141, 216, 256 }.

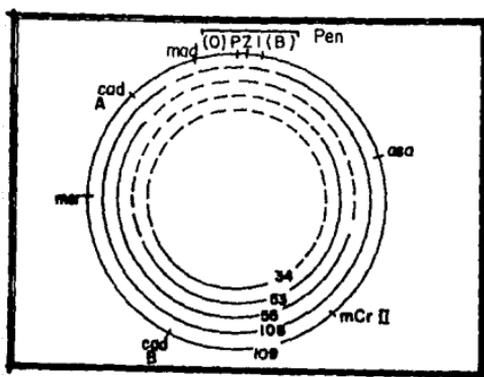


Fig.No 20

Mapa Genético del plásmido P11147.
Los genes CadA y CadB codifican resistencia al cadmio.

En la figura anterior se presenta el mapa genético del plásmido P11147, obtenido por un análisis

de delección , en el cual se observa que los genes Cad A, Cad B y Mad se encuentran separados . El gene Cad A , responsable de la resistencia a elevadas concentraciones de Cadmio , se sitúa entre los locus mer y pen, y el gene Cad B que promueve un intermedio nivel de resistencia , se encuentra entre los locus mer y lea . Por medio de un análisis de delección se obtuvieron 4 segmentos del genoma del plásmido . En los primeros 3 segmentos de DNA , solo se encuentra el gene Cad B , y en el segmento 10⁹ se presentan ambos genes (216)

Así como la resistencia al cadmio en Staphylococcus aureus y otros microorganismos se relaciona con plásmidos , estudios recientes indican que Alcaligenes entrophus CH34 porta genes cromosómicos que promueven dicha resistencia (103) .

4.2.3 Mecanismos de Resistencia de Los microorganismos al cadmio.

Informes recientes indican, que los microorganismos que hospedan plásmidos que codifican resistencia al cadmio presentan alteraciones que causan:

1. Reducción del transporte del cadmio (Cd^{2+}) a través de la membrana celular (141, 248, 256) .
2. Aumento en el sistema de excreción de los iones cadmio en la membrana celular (179, 247) .

El cadmio se transporta a través de la membrana microbiana por un sistema de transporte que utiliza un potencial eléctrico. Este sistema es específico para los iones cadmio (Cd^{2+}) y manganeso (Mn^{2+}) en todas las células (186, 214) (Fig.No. 21) .

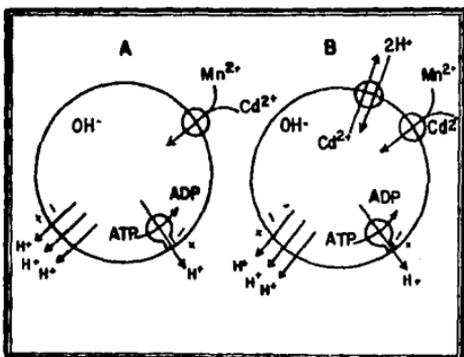


Fig.No.21 Modelo esquemático del transporte de iones Cd^{2+} a través de la membrana celular de microorganismos sensibles (A) y resistentes (B).

Diversos 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 (39,40,103,127,132,141). Para demostrar la disminución en el transporte del cadmio en microorganismos resistentes, Weiss y col., utilizan dos cepas de Staphylococcus aureus: RN23 (p1258) y RN1008 (sensible al Cd^{2+}), que inoculan en caldo triptona (16 g/l) suplementado con cloruro de sodio (10 g/l) y diferentes concentraciones de cadmio radioactivo (Cd^{115}). Los cultivos se incuban a una temperatura de 37°C en condiciones aerobias. Para medir la cantidad de Cd^{115} transportado, se toma una alícuota del medio de cultivo y se filtra a través de filtro Millipore y se mide la radioactividad en el filtrado obtenido por medio de un contador de centelleo. La disminución de la radioactividad en el filtrado, es proporcional a la cantidad de cadmio (Cd^{115}) transportado (Fig.No. 22).

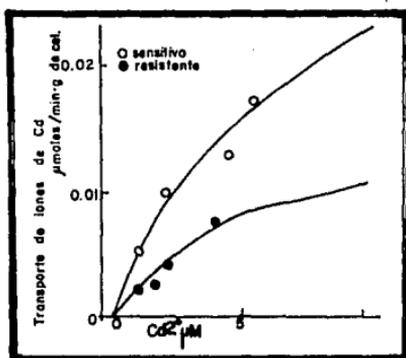


Fig.No. 22 Transporte de Cadmio por Staphylococcus aureus : RN1008 (sensible) y RN23 (resistente).

En la gráfica anterior se observa que al aumentar la concentración de Cd^{2+} , en los microorganismos sensibles aumenta el transporte de Cd^{115} , en cambio en los microorganismos resistentes disminuye.

Aún no se sabe que gene (Cad A ó Cad B) codifica la disminución en el transporte de los iones Cd^{2+} . Estudios que se realizan con diferentes cepas de Staphylococcus aureus, indican que las cepas que contienen cualquiera de los genes que codifican resistencia al cadmio (Cad A ó Cad B), disminuyen el transporte de este metal a través de la membrana (256 261) (Fig.No.23).

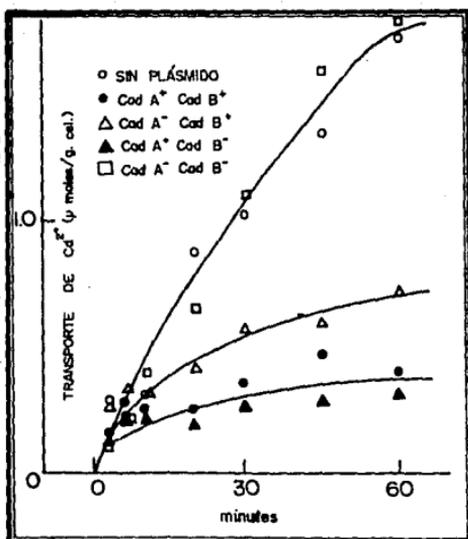


Fig.No.23 Transporte de iones Cd^{2+} por varias cepas de Staphylococcus aureus.

En la gráfica anterior se observa que las cepas que portan alguno de los dos genes que codifican resistencia al cadmio, promueve la disminución en el transporte de este metal .

Diversos investigadores señalan que el manganeso es un inhibidor competitivo del transporte del cadmio, debido a que su transporte disminuye cuando el microorganismo resistente se desarrolla en presencia de ambos iones (130,231,).

Algunos informes indican que el transporte de cadmio es dependiente de energía, ya que se inhibe en presencia de Carbonil cianuro, m-clorofenil hidrazona(desacoplante de cadena respiratoria) y 2,4-dinitrofenol(214,247,261). Reciente-

mente Weiss, demuestra que el transporte de cadmio es dependiente de energía y sensible a bajas temperaturas. Para demostrar lo dicho anteriormente, utiliza a *Staphylococcus aureus* RN1 que inocula en caldo triptonal (0.11 mg peso seco/ml) suplementado con cadmio (1.0 M) y diferentes inhibidores: Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP, 10 M), carbonil cianuro p-trifluorofenilhidrazona (FCCP, 100 M) y cianuro de sodio (20 mM). Los cultivos se incuban durante 5 min. a 37°C y posteriormente se mide la disminución de la radioactividad en el medio de cultivo. En la Fig. No. 24 se presentan los resultados del estudio.

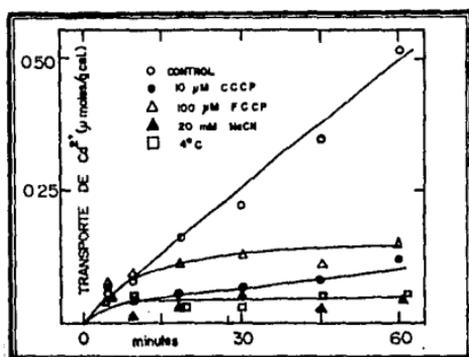


Fig. No. 24 Efecto de algunas sustancias químicas sobre el transporte de cadmio.

En la gráfica anterior se observa que el transporte de Cd^{2+} disminuye en presencia de los inhibidores, in-

dícando que es dependiente de energía. Este transporte también se afecta a temperaturas bajas (4°C) (130,247,252,253,256).

Otro factor de importancia en el transporte de cadmio a través de membrana es el pH. Estudios realizados con Staphylococcus aureus 17810, señalan que los microorganismos resistentes al cadmio transportan el metal cuando el pH es mayor de 6 (Fig.No.25).

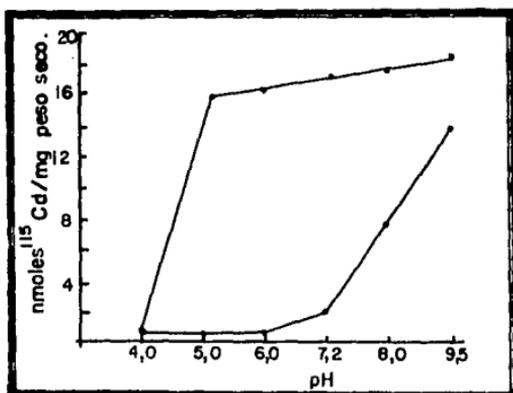


Fig.No. 25 Efecto del pH sobre el transporte de iones Cd^{2+} en Staphylococcus aureus: 17810 (Resistente), (●) y 17810 (Sensible), (○).

En la gráfica anterior se observa que a pH mayor de 6, los microorganismos resistentes, empiezan a transportar los iones Cd^{2+} a través de membrana, lo que sugiere que la resistencia de Staphylococcus aureus 1710R no solo se debe a la disminución del transporte de Cd^{2+} en la célula, sino a

una alteración en la permeabilidad de la membrana (247).

La resistencia de S. aureus 17810R al cadmio , también se debe a un sistema de "transporte -excreción" de estos iones a nivel de membrana, el cual regula la acumulación interna del cadmio. El cadmio es excretado por un sistema de protones que circulan a través de membrana, y promueven su excreción (Fig.No. 21). Tynecka y col. encuentran que este sistema se inhibe en presencia de 2,4-dinitrofenol , lo que sugiere que el transporte de iones cadmio requiere de energía. En elevadas concentraciones el cadmio compete con los protones , por lo que se lleva a cabo un sistema de intercambio $Cd^{2+}/2H^{+}$ (Fig.No. 21) (248,253).

Cuando la concentración de iones Cd^{2+} es elevada , el metal se acumula intracelularmente. Estudios realizados con Escherichia coli (Cd^b), indican que del total del cadmio acumulado intracelularmente el 56% se asocia a pared celular , el 13% a la membrana y el 31% al citoplasma , lo que indica que la mayor acumulación es a nivel de pared celular. En los microorganismos resistentes la acumulación de cadmio intracelular disminuye (149).

El cadmio que se acumula en el citoplasma se encuentra ligado a proteínas formando cadmio-metalotioneínas (132,149). Las metaloproteínas también se encuentran en mamíferos , levaduras , algas y hongos , y se piensa que pueden estar implicadas en la homeostasis y desintoxicación de los metales tóxicos (120). Estudios que realizan con Pseudomonas

putida indican la existencia de 3 diferentes metaloproteínas asociadas al Cadmio : CdBP₁, CdBP₂ y CdBP₃ (Tabla No. 20).

Tabla No. 20 Propiedades de las Cadmioproteínas bacterianas			
Proteína	presentes en la fase de crec.	P.M.	pI
CdBP ₁	exponencial	6,700	8.3
CdBP ₂	final de la exponencial	6,900	3.5-4.5
CdBP ₃	estacionaria	3,600	5.2

En la tabla anterior se muestran las propiedades de las cadmioproteínas. La primera metaloproteína CdBP₁, se sintetiza durante la fase exponencial de crecimiento, la segunda CdBP₂ durante un corto lapso al final de la fase exponencial de crecimiento, ambas proteínas se encuentran durante la fase estacionaria. La tercera proteína CdBP₃ solo está presente en grandes cantidades cuando se inicia la lisis celular durante la fase estacionaria de crecimiento (37,40,97,103).

Al analizar los aminoácidos presentes en las 3 cadmioproteínas se encuentra que todas poseen gran cantidad de residuos de cisteína, además, CdBP₁ contiene serina, glicina, alanina y valina; CdBP₂ contiene predominantemente serina, glicina, alanina y lisina; y CdBP₃ serina y glutamina ó glutamato. Como las proteínas contienen gran cantidad de residuos de cisteína, Higham los relaciona con los sitios capaces de reaccionar con el cadmio u otros metales (Zn, Cu). En la Fig. No. 26 se presenta un modelo de los sitios de interacción del cadmio y otros metales con las proteínas.

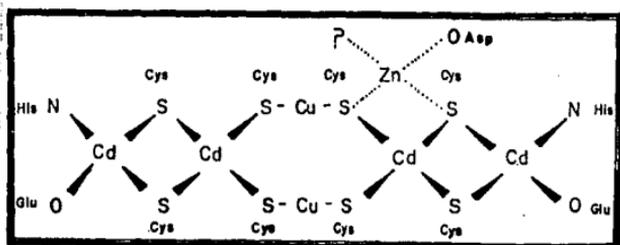


Fig. 26 Modelo de los sitios de interacción del cadmio, cobre y zinc con las proteínas de *Ps. putida*.

Diversos investigadores han observado, que cuando *Escherichia coli* se desarrolla en presencia de bajos pero no tóxicos niveles de cadmio, disminuye [84-95 %] la cantidad de colonias formadas y se detecta alteración en el genoma bacteriano. Una vez que el microorganismo se encuentra adaptado a los iones Cd^{2+} , la habilidad para formar colonias (CFU) se restaura y el genoma bacteriano se repara. En este sentido *Escherichia coli* es un microorganismo más activo que *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (132,149,150,151).

4.3 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL ZINC.

El zinc es un oligoelemento necesario para la formación de ciertas enzimas bacterianas (por ejem. Fosfatasa alcalina), aunque altas concentraciones de este elemento inhibe el crecimiento de los microorganismos (48, 49, 149).

Las sales de zinc son astringentes , corrosivas y débilmente antisépticas . Las sales solubles más ionizables como el Cloruro de zinc , son muy irritantes y se usan como escaróticos. El Sulfato de zinc se utiliza en la conjuntivitis que causa el bacilo de Morax-Axenfeld, M. Lacunata (80) .

El zinc puede afectar la población microbiana directamente debido a su toxicidad e indirectamente debido a los efectos del medio ambiente entre los cuales se encuentran: las altas temperaturas, la sequía y el aumento del pH; los cuales promueven la formación de óxido de zinc y con ello la elevación del pH del suelo . Otro factor importante es la pérdida de nutrientes , como consecuencia de la cual aumenta el transporte de zinc al interior de la célula . La toxicidad de este metal aumenta en presencia de elevadas concentraciones de Cloruro de sodio (167) .

La concentración de zinc en el medio ambiente se eleva constantemente , detectándose en lugares cercanos a fundidoras , suelos , lagos , ríos , mares , sedimentos y aguas de riego , lo que ocasiona la acumulación del metal en plantas y peces de consumo humano. Estudios realizados en el Mar Medite-

rráneo y ríos de Ottawa , demuestran que la concentración de zinc (820-846 mg/l) se encuentra arriba del nivel permitido (0.1-0.6 g/l) en agua de mar y 10 g/l en agua dulce , lo que promueve la acumulación de este metal en peces de importancia económica , en los cuales la concentración es de 0.9-11.7 mg/Kg (peso seco) (5,123,178). También se encuentra que en plantas de importancia en la agricultura acumulan este metal .Por ejemplo Kirham encuentra una concentración de Zinc de 29 ppm en jitomates ,153.3 ppm en cereales y 80 ppm en el frijol de soya (25,123).

Al elevarse la concentración de zinc en el suelo , agua , y sedimento , se desarrollan microorganismos resistentes a este metal . Jordan y Lechevalier estudian la contaminación por zinc en suelos cercanos a la fundidora de Palmenton, Pen., y relacionan el efecto de altas concentraciones del metal sobre la microflora presente . Los investigadores muestrean el suelo del horizonte A₁ , ya que evidencias indican que el 90% del Zinc se deposita en el suelo y se retiene hasta 15 cm de profundidad (117).

Las muestras que se obtienen del suelo se utilizan para determinar la concentración del zinc,pH , materia orgánica , No. de microorganismos viables y resistentes al zinc . La concentración del zinc se determina por espectrofotometría de absorción atómica . La muestra se trata con solución de ácido Nítrico y Perclórico (concentrado) 4:1 . La solución resultante se diluye con 500 ml de agua destilada y se determina la concentración del metal en el espectrofotómetro . Los

estudios demuestran que la conc. de zinc en el suelo cercano a la fundidora es significativamente alta (129,000-135,000 ppm). El suelo presenta un pH elevado.

Para estimar la cantidad de microorganismos viables y resistentes al zinc , se utiliza la técnica de cuenta en placa. El medio que se requiere para la cuantificación de bacterias totales es agar VP [Extracto de levadura-dextrosa] y para hongos y actinomicetos agar extracto Thin-Pabulum (Tbab) con neomicina (100 g/ml). Para el aislamiento de microorganismos resistentes al zinc se emplean los mismos medios suplementados con sulfato de zinc, utilizando distintas concentraciones 3M, 1000 M, 6000 M para bacterias y 6 M, 200 M, 1000 M para actinomicetos y hongos . Los cultivos se incuban a una temperatura de 23°C durante 4-10 días [las colonias de hongos y actinomicetos se incuban hasta tener un diámetro de 30 -80 mm].

Jordan y Lechevalier aíslan una gran variedad de microorganismos capaces de crecer en conc. elevadas de sulfato de zinc . La mayoría de los microorganismos que se aíslan son actinomicetos y hongos . Entre los actinomicetos se encuentran : Streptomyces sp. y Actinomadura dassonillei, ambas cepas son resistentes a una concentración de $ZnSO_4$ de 1000 M. Entre los hongos aislados se encuentran Penicillium sp., Mortierella isabelina, Paecilomyces sp., Torula sp. y Bdellospora sp., que resisten hasta una concentración de $ZnSO_4$ de 700 M (127).

Los investigadores logran aislar e identificar a un solo género bacteriano , Bacillus sp. resistente a

1000 M de $ZnSO_4$. Actualmente se tienen informes a cerca de otras bacterias que poseen resistencia a este metal: Alcaligenes entrophus, Pseudomonas putida , Bacillus acidocaldarius, Curtobacterium pusulum, Bacillus coagulans , Aerobacter aerogenes y Bacillus megaterium. Los mecanismos de resistencia de las bacterias mencionadas al zinc se estudian actualmente [98,103,252,253] .

4.3.1 Mecanismos de Resistencia de Los microorganismos

Ohija y Komau recientemente observan, en algunas bacterias resistentes al zinc, la existencia de un ácido graso en la membrana celular , el cual no presentan las bacterias sensibles a este metal. Para la realización de este estudio los investigadores inoculan 25 cepas resistentes al zinc en medio T que contiene: triptona, extracto de levadura , glicerol fosfato, sulfato de amonio , cloruro de calcio , sulfato de magnesio , cloruro de potasio , glucosa y cloruro de zinc (14 g/ml). Los cultivos se incuban a 30°C durante 24 horas y posteriormente se mide la densidad óptica . La composición de los ácidos grasos en la membrana bacteriana se realiza por un método de cromatografía gas-líquido, para el cual , las bacterias se lavan con agua destilada y se saponifican con una mezcla de metano-hidróxido de potasio al 15 % a una temperatura de 70°C durante 4 horas. La suspensión saponificada que se obtiene se lava con éter de petróleo y se analiza por cromatografía gas-líquido [. 98] .

De las 25 cepas estudiadas , 19 poseen en membrana celular un ácido graso que se identifica como el ácido w-Cielcheptil-undecanoico , lo que indica que puede existir al-

guna relación entre el ácido graso y la resistencia al zinc. Durante los estudios se observa que al incrementar la concentración de sulfato de zinc, también aumenta la del ácido graso presente en la bacteria (Tabla No. 21).

Tabla No. 21 Efecto del zinc en el crecimiento bacteriano y concentración de ácido graso formado.		
Concentración de Zinc (mM)	Crecimiento (%)	Porcentaje de ac. graso en la membrana celular
0	100	46.1
0.1	98.7	59.8
0.5	97.6	72.0
1.0	88.3	75.1
1.2	75.3	79.1
2.0	0.1	42.9

En la tabla anterior se observa que cuando el crecimiento disminuye, debido al aumento en la conc. de zinc, el porcentaje de ácido graso presente en la membrana también se incrementa. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la célula microbiana sintetice el ácido graso cuando adquiere la resistencia al zinc, por lo que la membrana celular es una importante barrera para la penetración del metal a la célula (98).

A la existencia de este ácido graso, en bacterias acidófilas-termófilas como: Bacillus acidocaldarius y Bacillus coagulans, se atribuyen las características especiales que mantienen la organización y la integridad celular (196).

Estudios que se realizan con Escherichia coli, indican que los iones zinc se transportan a través de

la membrana celular por una vía análoga al transporte del magnesio (253, 256), posteriormente el zinc actúa en dos sitios específicos:

1. Cadena Respiratoria. Algunos investigadores sugieren que la cadena respiratoria se inhibe a nivel de la succinato oxidasa oxidasa, NADH, lactato, flavoproteína y citocromo b, impidiendo el transporte de electrones (19, 210).
2. Transporte de Fosfato. Al inhibirse el transporte de fosfato se inhibe fosforilación oxidativa y como consecuencia no se lleva a cabo el transporte de citrato, glucosa y alanina a través de la membrana (210). Los datos indican que 1 mM de $ZnSO_4$, inhibe de 34-58% el transporte de fosfato.

Para comprobar la inhibición en cadena respiratoria de la Succinato Oxidasa, Kasa-hara, inocula Escherichia coli w3092 en un medio complejo que contiene (por litro): solución amortiguadora Tris (7.9 g), cloruro de sodio (3 g), fosfato ácido de potasio (2 g), Sulfato de magnesio hepta hidratado (0.25 g), cloruro de calcio (0.011 g), casaminoácidos (4 g) y glicerol (3 g), con un pH de 7.4. El cultivo se incuba a 37°C durante 24 horas en condiciones

aerobias . Posteriormente las células se lavan 2 veces con solución amortiguadora Tris-HCl (0.03 M, fría) a pH 8.0 . Los microorganismos se utilizan para la obtención de esferoplastos, para lo cual , las bacterias se suspenden en la misma solución amortiguadora suplementada con Sacarosa al 20% para obtener una densidad de 10^{11} células/ml . La suspensión se incuba a 37°C durante 5 minutos , posteriormente se añade simultáneamente lisozima (100 g/ml) y EDTA (10 mM) , se mezcla y se incuba a 37°C durante 40 minutos . Los esferoplastos se colectan por centrifugación a 8,000Xg (temperatura de -20°C) durante 30 minutos y se rompen las células por un proceso de congelación-descongelación en cloruro de magnesio (5mM) . La suspensión obtenida se trata con DNAasa pancreática (20 g/ 10^{11} células) , se incuba a una temperatura de 20°C durante 30 minutos para después centrifugar a 30,000Xg durante 30 min , con el objeto de obtener las membranas citoplásmicas . Posteriormente se determina el efecto del zinc y otros cationes en la actividad de la enzima Succinato oxidasa utilizando un oxímetro, para lo cual el precipitado obtenido (5.9 mg) se adiciona 3.8 ml de sol. amortiguadora Tris (50 mM) pH 8.0 . cloruro de magnesio (1 mM) , y diferentes concentraciones de cationes divalentes (tabla No. 22) , y como sustrato succinato sódico (20 mM) , la mezcla se incuba a una temperatura de 25°C durante 5 min. con agitación vigorosa y finalmente se mide el consumo de oxígeno . En estas condiciones la actividad de la succinato oxidasa (control) es proporcional al consumo

de oxígeno (5.3 mmol/min) . En La Tabla No. 22 se observan los resultados que se obtienen de este estudio.

Tabla.No.22 Efecto de los iones divalentes en la actividad del Sistema Succinato Oxidasa.

	Concentración de los cationes divalentes (mM)	Porcentaje de inhibición (%)
ZnSO ₄	0.01	17
	0.1	100
	1.0	100
HgCl ₂	0.01	61
	0.1	100
CdCl ₂	0.1	61
CaCl ₂	0.1	21
CoCl ₂	0.1	6
MnCl ₂	0.1	4

En la tabla anterior se observa que los iones zinc y mercurio inhiben completa o parcialmente la actividad de la Succinato Oxidasa . La disminución en el consumo de oxígeno es de 68-90 % , cuando se utilizan como sustratos NADH(0.5 mM) y Lactato (10 mM) (121) .

Para demostrar el segundo sitio de inhibición en cadena respiratoria , Nicholls trabaja con partículas submitocondriales , las cuales se obtienen por centrifugación a pH 7.4 . Por espectrofotometría se observa el efecto de los iones zinc sobre los citocromos b , c+c₁ y flavoproteína (Fig. No. 27) .

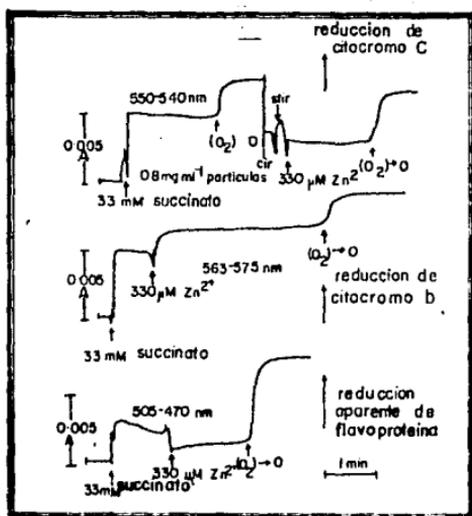


Fig.No. 27 Efecto del zinc en el estado de reducción de los citocromo b,c+c₁, y flavoproteína.

En la figura anterior se observa una disminución en los niveles de oxidación del citocromo b y la actividad de la flavoproteína se reduce al 100%, lo que indica que el sitio de interacción del zinc es a nivel de flavoproteína (470 - 505 nm) y el citocromo b (563 - 575 nm). Los mismos investigadores indican que cuando las partículas submitocondriales se encuentran en presencia de antimicina se observa un incremento en la reducción del citocromo b y una disminución en la reducción de flavoproteína (164).

Evidencias indican que algunas bacterias resistentes al zinc tienen la propiedad de reducir este

metal (164)].

4.3.2 Plásmidos que codifican resistencia al zinc.

La resistencia de los microorganismos al zinc se relaciona con la presencia de plásmidos bacterianos. Silver y Tapan relacionan la resistencia al zinc con la del cadmio, porque los microorganismos que hospedan los plásmidos pI258, pPRN2014, pR254 y pPI1147, presentan resistencia a ambos metales, lo que indica que los genes *CadA* y *CadB* o bien un gene cercano, promueve la resistencia al zinc. Las figuras No. 28 y 29 presentan las curvas de crecimiento de *S.aureus* (*CadA*⁺ *CadB*⁺), a distintas concentraciones de Cd^{2+} y Zn^{2+} .

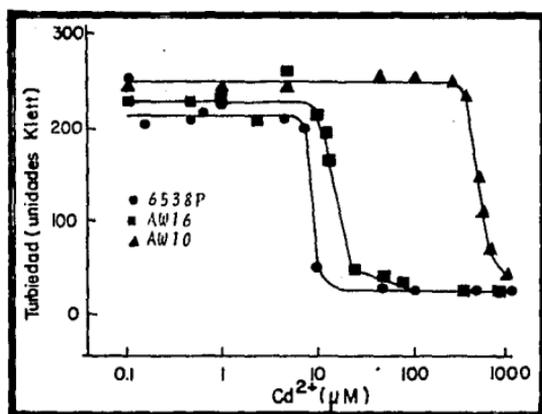


Fig. Curvas de crecimiento de microorganismos resistentes al Cd^{2+} .

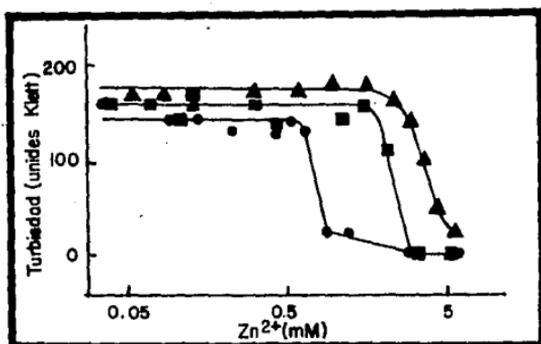


Fig.No.29 Curvas de crecimiento de Staphylococcus aureus sensible y resistente al cadmio, que presentan resistencia al zinc.

En las figuras anteriores se muestran las curvas de crecimiento de Staphylococcus aureus 6538P (sensible al cadmio), AW16 (CadA⁺) y AW161 (CadB⁺). La figura demuestra que las cepas que poseen los genes CadA y CadB, también presentan resistencia al zinc (173,186).

4.4 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DE LA PLATA Y SUS DERIVADOS

Durante miles de años , la plata se emplea en la medicina , y adquiere fama cuando Paracelso (Teofasto Bombast Von Hohenheim, fundador de la medicina experimental) la recomienda para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso. Antes del descubrimiento de la penicilina , el nitrato de plata se utiliza en forma t6pica para la profilaxis de la Otitis Gonococcica Neonatal y en el tratamiento de la Epilepsia, ocasionalmente el nitrato de plata (al 0.5%) se utiliza para el tratamiento t6pico de personas con quemaduras (31,40,80,81, 82,139).

Las sales de este metal inhiben la actividad de las enzimas que contienen grupos sulfhidrilos , probablemente debido a la reacci3n del i3n arg6ntico con los grupos -SH. Sin embargo , no todos los efectos de las sales de plata se pueden atribuir a esta reacci3n . El i3n plata tambi6n se combina con algunas fracciones bio l6gicamente importantes , como los grupos amino ,imidazol , carboxilo , y fosfato. En elevadas concentraciones provoca lesiones de las membranas y las estructuras intracelulares , adem6s de desnaturalizar las prote6nas (47,80).

Actualmente el nitrato de plata y los complejos prote6na-plata se usan como antis6pticos y germicidas (138). Algunos informes indican que la ingest3n de una sal soluble de plata en concentraci3n suficientemente alta , provoca la corrosi3n de la mucosa del sistema digestivo(31).

En los últimos años aumenta notablemente la incidencia de microorganismos que presentan resistencia a altas concentraciones de nitrato de plata (21,96). Los mismos se aíslan ,frecuentemente de pacientes hospitalizados (con quemaduras y traqueotomías).

Hendry y Stewart aíslan microorganismos , Gram positivos y Gram negativos resistentes al nitrato de plata, de secreciones de enfermos del Hospital de Halminton , Canadá. Las muestras de secreciones se inoculan en agar Extracto de levadura - triptonal (TYE) con diferentes concentraciones de nitrato de plata (0.05 , 0.1 , 0.25 y 0.5 mM) y se incuba a una temperatura de 37°C durante 24 horas . Los resultados se muestran en la Tabla No. 23

Tabla No. 23 Susceptibilidad de los microorganismos a diferentes concentraciones de Nitrato de Plata.						
Microorganismos	No. de cepas aisladas	Crecimiento (%)				
		Concentración de AgNO_3 (mM)				
		0	0.05	0.1	0.25	0.50
Gram negativo	178	100	97.2	87.6	62.4	0
Gram positivo	253	100	99.6	77.1	37.5	2.4

En la tabla anterior se observa que los microorganismos Gram negativos son más resistentes al nitrato de plata que los microorganismos Gram positivos .

Posteriormente se realizan pruebas para la identificación de los microorganismos aislados . A continuación se enumeran los microorganismos identificados:

<u>Klebsiella aerogenes</u>	<u>Diplococcus pneumoniae</u>
<u>Enterobacter aerogenes</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
<u>Bacterium amratum</u>	<u>Staphylococcus epidermidis</u>
<u>Klebsiella sp.</u>	<u>Streptococcus faecalis</u>
<u>A. anitratus</u>	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>
<u>Proteus spp.</u>	<u>Acinetobacter spp.</u>
<u>Serratia spp.</u>	<u>Enterobacter sp.</u>
<u>Haemophilus influenzae</u>	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>Escherichia coli (lac⁻)</u>
<u>Proteus mirabilis</u>	<u>Citrobacter freundii</u>
<u>Klebsiella azoena</u>	<u>Salmonella typhimurium</u>

Los estudios estadísticos realizados hasta 1974 indican, que el 90 % de las cepas aisladas son resistentes al Nitrato de plata. Stewart y Hendry aislan microorganismos resistentes de secreciones de traqueotomías y quemaduras, los resultados se presentan en la Tabla siguiente:

Tabla No. 24 Relación de microorganismos resistentes al Nitrato de plata (0.5mM) aislados de secreciones de traqueotomías y de quemaduras.		
Microorganismos aislados	quemaduras	Secreciones de: traqueotomías
<u>Klebsiella pneumonae</u>	5	3
<u>Enterobacter cloacae</u>	3	1
<u>Escherichia coli</u>	2	
<u>Escherichia coli NFL</u>	2	
<u>Proteus mirabilis</u>	1	
<u>Citrobacter freundii</u>	1	

Los datos de la tabla anterior indican que existe un mayor número de microorganismos resistentes al nitrato

de plata en secreciones de quemaduras que de traqueotomías . La mayoría de los microorganismos resistentes al nitrato de plata , también poseen resistencia a otras sales como : Sulfo-diazina de plata y Benzoato de plata

4.4.1 Efecto de los iones Plata en el metabolismo de los microorganismos.

Los iones plata son altamente tóxicos para los microorganismos debido a que inhiben la oxidación de la glucosa , glicerol , fumarato , succinato , y D,L-lactato. En Echerichia coli se inhibe el transporte del succinato a través de la membrana celular , la enzima Glutamato deshidrogenasa (dependiente de NADP) y cadena respiratoria (18).

Informes recientes indican que la cadena respiratoria se inhibe a dos niveles: El sitio más sensible se localiza entre el sustrato que interacciona con cadena respiratoria (NADH o Succinato deshidrogenasa) y la favoproteína . El segundo nivel de inhibición se encuentra entre el citocromo b y el citocromo a_2 (Fig. No. 30) (19,124).

El transporte de fosfato extracelular e intracelular también se inhibe en presencia de iones plata. W.J.A Schreurs realiza estudios con dos cepas de Escherichia coli K-12: AN710 que presenta el sistema de transporte Pit (sistema de transporte de fosfato) y AN1088 que presenta el sistema de transporte Pst (sistema de transporte específico de fosfato) (197 202). Las bacterias se desarrollan en un medio que contiene : K_2HPO_4 (30mM), NaH_2PO_4 (20 mM) , $MgSO_4$ (0.4 mM) y $(NH_4)_2SO_4$

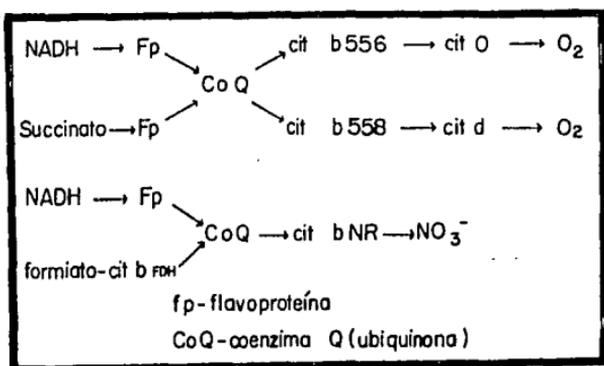


Fig.No. 30 Representación esquemática de la cadena respiratoria de Escherichia coli

(8 mM), suplementado con tiamina(3 M), 2,3-dihidroxi-benzoato (10 M), arginina(1 mM), glucosa o succinato(20 nM), fosfato radioactivo(P^{32}) y diferentes concentraciones de nitrato de plata . Los cultivos se incuban a una temperatura de 37°C , con agitación durante 12 horas , posteriormente se colectan por centrifugación y el paquete celular se resuspende en una solución que contiene : Trietanolamina-HCL(50 mM), KCL(15 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (10 mM), $HgSO_4$ (1 mM), succinato(5 mM) o glucosa (1mM) y fosfato radioactivo (P^{32}), se incuba en agitación a una temperatura de 37°C durante una hora y se mide la absorbancia a 660 nm. Después de medir el transporte de P_i , a los cultivos se les adiciona bromuro de potasio (2mM) para remover el exceso de iones Ag^+ y se mide nuevamente absorbancia . Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla No. 25

Tabla No.25 Inhibición del transporte del fosfato o fósforo inorgánico por los iones plata .

Cepa	fuente de energía	adición de KBr (mM)	Concentración de $AgNO_3$ (μM) para inhibir:	
			50 %	90%
AN710	Succinato	0	1.2	3.7
		2	1.7	8.6
	Glucosa	0	2.6	4.7
AN1088	Succinato	2	3.3	12.6
		0	3.3	50
	2	7.6	79	
	Glucosa	0	4.0	71
		2	12.0	96

En la tabla anterior se observa que se requiere mayor cantidad de iones plata para inhibir el transporte de fosfato de la cepa AN1088. Durante estos estudios se demuestra que el tratamiento de las células con nitrato de plata inhibe en ambas cepas microbianas el transporte de fosfatos (Fig. No. 32)

En las gráficas de la Fig.No.32 se observa que al agregar los iones plata decrece el transporte de fosfato y aumenta cuando se agrega el bromuro de potasio(210) .

Los iones plata modifican la permeabilidad de la membrana celular , lo cual causa la acumulación de prolina , glutamina , manitol , succinato y la excreción del fosfato esterificado ; además reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas , colapsa la fuerza promotora de protones , inhibe algunas enzimas bacterianas dependientes de NADP[Glutamato deshidrogenasa] y actúa a nivel de cadena respiratoria(19,210) .

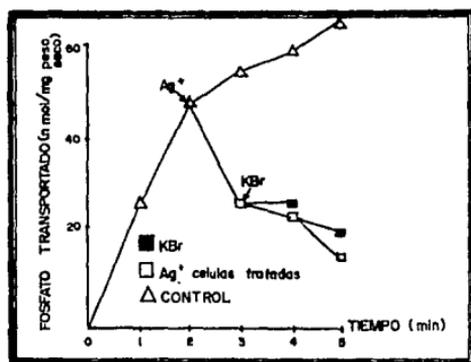
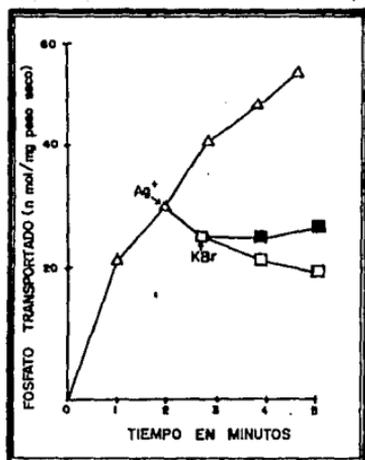


Fig. No. 32 Inhibición del transporte del fósforo (P^{32}) por adición de iones plata ($AgNO_3$ $20 \mu M$ y KBr $2mM$).

Estudios que realiza Bragg con Echerichia coli indican que los iones plata inhiben cadena respiratoria en dos sitios: el primero se encuentra entre NADH o succinato y flavoproteína, y el segundo sitio de inhibición se presenta a nivel de citocromo b y citocromo a₂. Los sitios de interacción de los iones plata en cadena respiratoria se pueden estudiar con el uso de Hidrosulfito de sodio (Ditionita) y se observa su efecto en presencia de diferentes concentraciones de nitrato de plata (Fig.No. 33) (19).

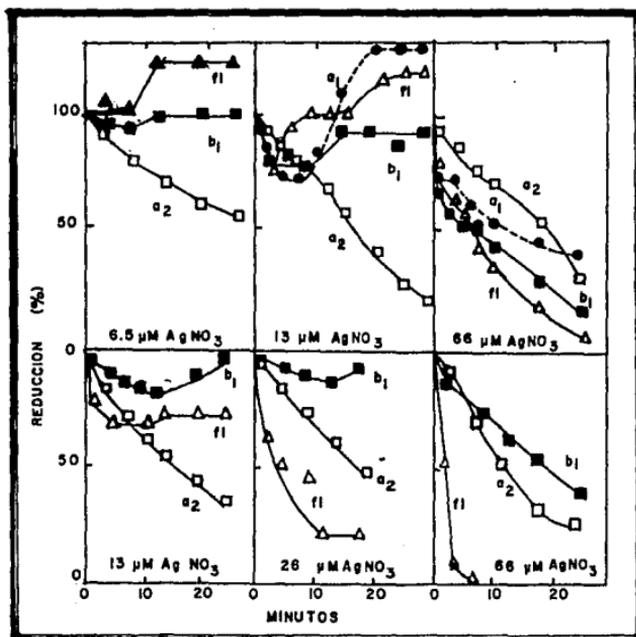


Fig.No. 33 Efecto de diferentes concentraciones de $AgNO_3$ sobre los diferentes componentes de la cadena respiratoria en células completas (a-c) y membranas (d-f).

En las gráficas que se presentan en la figura anterior se observa que a una concentración de $13 \mu\text{M}$ de AgNO_3 , se induce la oxidación del citocromo a_2 (Fig.No. 34). Cuando la concentración de los iones plata es mayor (26 y 66 μM de AgNO_3) se induce la oxidación de la flavoproteína y el citocromo b_1 .

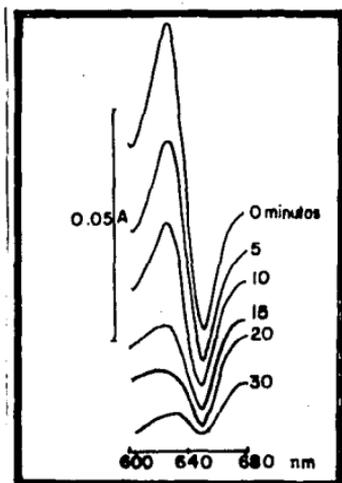


Fig.No. 34 Efecto del nitrato de plata en el estado de oxidación-reducción del citocromo a_2 .

La figura anterior muestra una serie de espectros de reducción en los cuales se observa el efecto de la

plata sobre el citocromo a_2 .

Cuando la concentración de nitrato de plata es elevada, y el sustrato y el oxígeno se consumen totalmente, se puede observar el efecto de los iones plata entre NADH o succinato y el citocromo b_1 (Fig.No. 35).

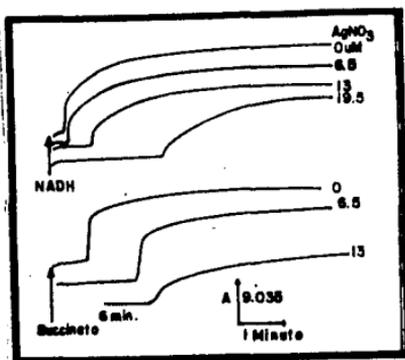


Fig.No.35 Efecto del Nitrato de plata en la reducción del citocromo b_1 , en membranas.

En la figura anterior se observa que los iones plata actúan a nivel del citocromo b_1 . Esta inhibición es proporcional al aumento de la concentración de plata.

Estudios recientes indican que los iones plata pueden inhibir un 80 % de la cadena respiratoria (19).

4.4.2 Plásmidos que codifican resistencia a la plata .

Diversos investigadores sugieren que la resistencia de las bacterias a la plata , se relaciona con la presencia de plásmidos (19,49), los cuales se transfieren de una bacteria a otra por medio de conjugación . Para comprobar que la resistencia se puede transferir por conjugación, McHugh utiliza como bacteria donadora Salmonella typhimurium (Ag^r) y como recipiente una cepa de S. typhimurium(Leu^{-50}, nal^r), ambas cepas se inoculan en caldo TVE y se incuban a $37^{\circ}C$ durante 2 horas . Para aislar la cepa transconjugante , la mezcla de conjugación se inocula en agar mínimo adicionado con leucina (80 g/ml) y ácido nalidíxico .Para comprobar que la cepa transconjugante es resistente a los iones plata , se inocula en medio selectivo con nitrato de plata , en el cual se observa el crecimiento de la trasconjugante obtenida . Los investigadores demuestran que la frecuencia de conjugación entre las bacterias utilizadas en el estudio es elevada (3.6×10^{-2}) y muy frecuentemente las cepas transconjugantes adquieren resistencia al mercurio y a la plata (96).

Foster y col. aislan de Escherichia coli el plásmido pMG101 y de Salmonella typhimurium el pMGH, ambos plásmidos se transfieren por conjugación . Cuando los microorganismos se inoculan en medios con diferentes antibióticos y metales , los investigadores encuentran que los plásmidos antes mencionados codifican resistencia al mercurio , plata , gentamicina , ampicilina y sulfonamida , lo que indica que los plásmidos confieren múltiple resistencia a la bacteria transconjugante (49,96).

4.5 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL CROMO, COBALTO Y NIQUEL.

Metales como el cromo , cobalto y níquel se encuentran en pequeñas concentraciones en la naturaleza, sin embargo , al alterarse su concentración en el ecosistema, causan efectos nocivos en microorganismos , animales y humanos (68,229). Recientemente M.A. Salamanca y colaboradores , determinan la concentración de níquel en la Bahía de Concepción (23.7 ppm), en la Bahía de San Vicente (45.6 ppm) y el Golfo de Aranco (17.5 ppm). Las concentraciones encontradas sobrepasan el nivel máximo permitido (203). El metal antes mencionado se detecta también en la Laguna de Ostión en Coatzacoalcos , Veracruz, en donde la concentración determinada hasta el año de 1986 fluctúa entre 24 - 85 ppm (68,183).

La contaminación por mercurio y plomo es mayor que la causada por el níquel , cromo y cobalto ; de cualquier manera , concentraciones elevadas de estos metales son de gran importancia debido a los grandes problemas ecológicos que ocasionan (16,68,214,269).

En el hombre , el cobalto bloquea la acción de ciertas enzimas que intervienen en el transporte de hierro, produciendo una disminución en los eritrocitos y como consecuencia Hipoxia intracelular . En elevadas concentraciones , el cloruro cobaltoso deprime la producción de eritrocitos y causa cianosis, insuficiencia cardíaca , malestar general , anorexia , fatiga, coma y muerte (38,80,222).

Algunos investigadores señalan que cuando los iones cobalto y níquel se encuentran en elevadas concentraciones (0.1 - 1 mM), inhiben el transporte de los iones magnesio en Escherichia coli, además sustituyen al magnesio promoviendo su expulsión intracelular y existe una acumulación de cobalto y níquel, lo que indica que ambos metales son inhibidores competitivos del transporte de magnesio (254). Los estudios que realizan Nelso y Kennedy demuestran que el desarrollo de Escherichia coli A324, se inhibe en presencia de bajas concentraciones de cobalto y ausencia de magnesio, en cambio en su presencia disminuye el efecto letal del cobalto. El cobalto se transporta a través de membrana celular por el sistema responsable del transporte del magnesio, y se acumula intracelularmente por un proceso dependiente de energía y temperatura (165, 252). El efecto de los iones Cobalto y níquel es similar en Enterobacter aerogenes, Neurospora crassa y Bacillus megaterium (253, 254).

El níquel, también inhibe el transporte de azúcares a través de membrana celular, debido a la interacción (cambio conformacional) entre los iones níquelosos y el fosfato presente en la superficie celular. Diversos investigadores han observado que la inhibición de este transporte se acentúa con el incremento de la temperatura y la concentración de los iones Ni^{2+} (221).

En algunos lugares donde la contaminación por cromo, cobalto y níquel es elevada, se aíslan microorganismos resistentes a estos metales. Esta resistencia se adquiere

re por medio de plásmidos , los cuales se estudian actualmente (69,214).

Los microorganismos resistentes al cobalto y níquel , no llevan acabo la transformación de ambos metales, en cambio los microorganismos resistentes al cromo realizan la transformación del metal como un mecanismo de resistencia .Algunos informes señalan que ciertas bacterias son capaces de metilar el cromo(II) y obtener metilcromo , que es muy inestable y reacciona formando cromo(III) y metano . Estos microorganismos utilizan como donador de grupos metilos a la metilcobalamina (194). Otros estudios indican que algunos microorganismos son capaces de reducir al cromo(IV) que es altamente tóxico , a una forma de menor toxicidad,el cromo(III).Estas transformaciones se confieren por medio de plásmidos (214).

4.5.1 Plásmidos que promueven resistencia al cromo , níquel y cobalto.

Análisis de sedimentos del río de Hudson, Nueva York ,indican la existencia de una elevada concentración de cromo , cromato y dicromato. De estos sedimentos se aíslan microorganismos resistentes y se identifican los siguientes géneros bacterianos: Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas fluorescens. Todas las bacterias anteriores son portadoras de plásmidos que codifican resistencia al cromo y cromato (16,25).

El procedimiento que se utiliza para el aislamiento del plásmido de Pseudomonas fluorescens a partir de las bacterias resistentes al cromo y cromato es el siguiente : los microorganismos se inoculan en caldo Vogel-Bonner(VB) adi-

cionado con cromato de potasio (2,500 g/ml) y se incuba en agitación a una temperatura de 30°C durante 24 horas (la densidad del cultivo microbiano debe de ser de 30 - 200 unidades Klett). El cultivo bacteriano se lava 2 veces con 40 ml de solución TE, posteriormente se añade Pronasa B (500 g/ml) y dodecil sulfato de sodio al 1%, se incuba a una temperatura de 37°C durante 45 min y se mezcla durante 2 min. El material genético bacteriano se desnaturaliza en condiciones alcalinas añadiendo NaOH (3N) hasta alcanzar un pH de 12.1 - 12.3 y se agita durante 10 min, después se le adiciona solución amortiguadora Tris (2 M, pH 7) para disminuir el pH a 8.5 - 9.0 y se agita durante 3 min. El DNA extracromosomal se extrae con una solución de fenol-cloruro de sodio (1:1) y se centrifuga a 1000 - 1500 X g durante 5 min. La fase acuosa se extrae con 600 ml de una solución de cloroformo- alcohol isoamílico (24 : 1) y se le añade fosfato de magnesio (3mM) y alcohol etílico frío al 95% para precipitar el DNA y concentrarlo (a una temperatura de -20°C durante mínimo 2 horas), y se centrifuga a 6000 g durante 5 min. El sedimento se suspende en EDTA (0.1 M, 4°C) durante 24 horas. Del dializado se toma una alícuota de 8ml, y se le añade cloruro de cesio (8 g) y 0.6 ml de bromuro de etidio (10 mg/ ml de agua destilada); la solución se centrifuga a 35,000 rpm a una temperatura de 14°C durante 50 - 70 horas. Al terminar el tiempo de centrifugación se observa una intensa banda que pertenece al DNA extracromosomal. El DNA del plásmido se purifica por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido

mido aislado se identifica como pLHBI y es transferible por conjugación a Escherichia coli AC80 (16,49).

De la misma manera se logran aislar plásmidos de Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y recientemente de Streptococcus lactis (59,173,226).

Summers y Jacoby realizan estudios con una colección de plásmidos aislados de Pseudomonas aeruginosa de suelo y aguas residuales de hospitales (34,92,93,94,95, 173,215, 216,218,219,). Los investigadores encuentran que las cepas que hospedan plásmidos que confieren resistencia a antibióticos, toleran cierta concentración de cromato de sodio. De todos los plásmidos utilizados en el estudio, se observa que el plásmido pMG6 es el único que confiere resistencia al cromato (Tabla No. 26) pero no al nitrato crómico. En la Tabla No. 26 se muestra la lista de plásmidos de P. aeruginosa que se utilizan en el estudio. Los microorganismos que hospedan al plásmido pMG6 resisten elevadas concentraciones de cromato (50 mM). Este plásmido también promueve la resistencia al mercurio (34,214,225).

Estudios realizados con Pseudomonas aeruginosa PU21, demuestran que cuando la bacteria hospeda al plásmido pMG6 es resistente al cromato de sodio, en cambio si el microorganismo hospeda otro plásmido como el pMG1 no muestra resistencia al compuesto mencionado anteriormente (Fig. No. 36).

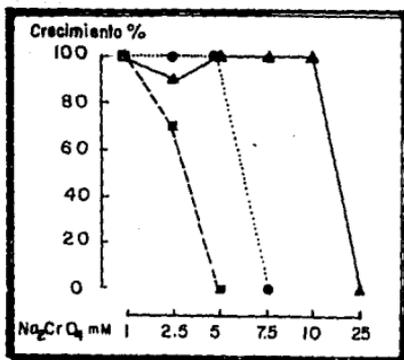


Fig. No. 36 Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (●), PU21(pMG1) (■), y PU21(pMG6) (▲), en presencia de cromato de sodio.

Aunque aún no se sabe cual es el mecanismo de resistencia al cromo y cromato, recientes informes indican que en *Staphylococcus lactis*, la resistencia al cromato se relaciona con plásmidos que promueven la fermentación de la lactosa [pLM3001, pLM2201, pLM2103, pLM2001, pLM2101, pLM2102 y pLM1801]. Estos plásmidos gobiernan cierto mecanismo por el cual, disminuye la permeabilidad de la membrana celular, y no penetra el cromato al interior de la célula [59].

Durante una investigación realizada en 43 laboratorios de análisis bacteriológicos en clínicas locales de Boston, se aislan 14 cepas microbianas capaces de desarrollarse en un medio de cultivo que contiene 3×10^{-3} M de cobalto y níquel. De las 14 cepas bacterianas aisladas, solo una identificada como *Escherichia coli* es capaz de transferir la resistencia a otros microorganismos como *Salmonella thyphimurium* [215, 226].

Los genes que codifican resistencia al cobalto y níquel se encuentran separados, ya que se han logra-

Tabla No 26 Susceptibilidad de los plásmidos de Pseudomonas aeruginosa al cromato de potasio.

Plásmido	grupo Inc.	Fenotipo	Conc. Mínima inhibi- toria de Na ₂ CrO ₄ (mM)
RP4	P-1	CbKmTc	5
R30	P-1	CbKmTc	5
R68	P-1	CbCmGmKmSmTc Hgr	5
R527	P-1	KmSmSuTcHgr	5
R720	P-1	CbKmSmSuTcHgr	5
R839	P-1	CbCmGmKmSmSuTcHgr	5
R1033	P-1	CbKmSuTcTmHgr	5
RP4-pMG5	P-1	CbCmGmKmSmSuTc	5
RP4-RPL11	P-1	GmSmSuHgrTerUv	5
pMG1	P-2	GmSmSuHgrTerUv	5
pHG2	P-2	KmSuTmHgrPmrTer	10
pHG5	P-2	CmGmKmSmSuTmHgrTer	5
pHG6	P-2	CmGmKmSmSuTmHgrTerCr	50
RPL11	P-2	CbCmGmSmSuTcHgrPmrTer	5
R38	P-2	SmSuTcHgrPmrTer	10
R39	P-2	SmSuTcHgrPmrTer	10
KR61	P-2	CmSmSuTcHgrPmrTer	5
Rm6159	P-2	CmSmTcHgrPmrTer	5
R931	P-2	SmTcHgrTerUv	5
CAM	P-2	CamUvTer	5
pH67	P-3	GmKmSuTmHgr	5
Rip64	P-3	CbCmGmSuTmHgr	5
R679	P-4	SmSu	5
R1162	P-4	SmSu	5
R5265	P-4	SmSu	5
Rm6163	P-5	CmSuTc	5
Rm6149	P-6	CbGmSmSu	5
Rm6148	P-7	Sm	5
FP2	P-8	HgrPmr	5
R2	P-9	CbSmSuUv	5
pH618	P-9	CbGmKmSmSuHgr	5
R91	?	Cb	5
RPI-1	?	Cb	5
RP8	?	Cb	5
R716	?	SmHgr	5
R3108	P-2	SmSuTcHgrPmrTer	5

do aislar cultivos de Escherichia coli y Salmonella typhimurium resistentes a uno de los dos metales . Aunque se señala que la resistencia al níquel y cobalto se promueve por plásmidos, aún no se presentan evidencias de su aislamiento e identificación(216).

4.6 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL COBRE .

Las sales del cobre se usan extensamente en la agricultura como fungicidas ,siendo esta la causa de su acumulación en el suelo y de ahí en vegetales.(80).

Recientemente Osuna-Pérez realiza estudios en la laguna y playas cercanas a Coatzacoalcos,Veracruz, en donde se encuentra que el agua de los lugares cercanos a las industrias del petróleo están contaminadas por una gran variedad de residuos químicos,especialmente hidrocarburos y metales pesados. Entre los metales pesados detectados , el cobre es uno de los que se encuentra en mayor concentración (15.0-41.0 ppm en agua y 2.58 g/g de suelo seco)(183).Constantemente se aislan de estos lugares microorganismos resistentes a este metal (53,167).

Aún no se sabe si los microorganismos pueden transformar el cobre ó sus sales en formas menos tóxicas. Existen evidencias que indican , que la resistencia al cobre y sus derivados se relaciona con plásmidos , los cuales se estudian actualmente (83,104). La resistencia a este metal también se observa en halobacterias , de las cuales el 75% hospedan por lo menos un plásmido y en algunas cepas se detectan de 3 a 4 plásmidos .Tenaz y Luke realizan estudios con 4 cepas de Escherichia coli (RJ95,RJ94,RJ92,yRJ93)resistentes al sulfato de cobre (20 mM) , y aislan de ellas un plásmido por electroforesis en gel de agarosa que designan como pRJ1004(78,000 megadaltons), que promueve dicha resistencia . Este plásmido es capaz de transmitirse por conjugación y presenta incompatibilidad

con los plásmidos que pertenecen a los grupos de Inc. I2 (pR144drd-3, pR648 y pR64drd-110 y K (pR387) (235).

Estudios que se realizan con el plásmido pRJ1004 revelan que en Escherichia coli K-12 confiere un incremento en la sensibilidad al zinc , y eleva la resistencia a las radiaciones ultravioletas , pero no codifica resistencia para antibioticos , ni se relaciona con la resistencia a otro metal pesado.

Ishihara y col. reportan la existencia del plásmido RTs1 que se aísla de una cepa de Proteus vulgaris Pm17 por electroforesis en gel de poliacrilamida . Este plásmido se transfiere por conjugación a Escherichia coli K-12 y promueve resistencia a la Kanamicina . Su transferencia por conjugación es sensible a la temperatura (104).

Estudios recientes revelan la existencia de una proteína T (sensible a la temperatura) y una DNAasa extracelular en la membrana celular de las bacterias que hospedan al plásmido RTs1 . Esta proteína inhibe la penetración de sustancias hidrofílicas con bajo peso molecular , en las que se incluye el cobre (Cu^{2+}) . Lerch sugiere que la proteína T se relaciona con las cobre-metaloproteínas de Neurospora crassa. Estas proteínas se encuentran presentes cuando los microorganismos se desarrollan en elevadas concentraciones de sulfato de cobre . Las cobre metaloproteínas contribuyen a la desintoxicación del microorganismo y funcionan como donadores de metales para las enzimas que los requieren como cofactores para su actividad enzimática (136). En la Fig. No. 37 se pre-

presenta un modelo de las cobre metaloproteínas de Neurospora crassa.

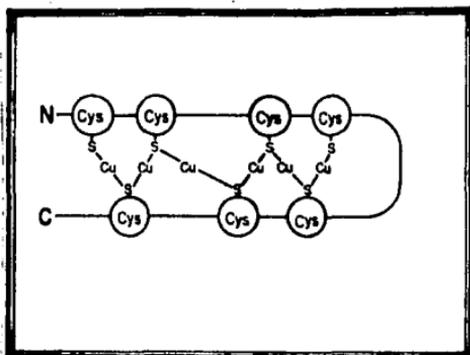


Fig.No.37 Modelo propuesto de las cobre metaloproteínas de Neurospora crassa.

4.7 MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN DEL MOLIBDENO, TUNGSTENO Y VANADIO.

El Molibdeno es un metal que forma parte de algunas enzimas microbianas, como por ejemplo; Escherichia coli requiere de este metal para la formación de la enzima nitrato reductasa (NR) (169) y de molibdato para las enzimas Formiato deshidrogenasa (FDH), Formiato oxidasa y el citocromo b_{555} . Enoch establece que Escherichia coli requiere de la enzima Nitrato reductasa y el citocromo b_{555} para que se desarrolle en presencia de nitratos en condiciones anaerobicas. Aún no se determina si la Formiato deshidrogenasa contiene molibdeno ó molibdato, pero se sabe que juegan un papel importante en la formación de esta enzima (114, 137).

Muchos investigadores reportan que en Aspergillus niger el tungstenato es un inhibidor competitivo del molibdeno y además antagoniza la formación de la enzima Formiato deshidrogenasa y Nitrato reductasa (114, 169).

Así como los microorganismos necesitan de ciertas concentraciones de Tungstenato ó molibdato, altas concentraciones (10^{-2} a 10^{-4} M) de estas sales inhibe la formación de la enzima Nitrato reductasa y disminuye el transporte de magnesio (Mg^{2+}) a través de membrana en Bacillus subtilis y Bacillus megaterium. Si el tungsteno se encuentra en altas concentraciones se inhibe la enzima Nitrato reductasa en un 54% y la enzima Formiato deshidrogenasa un 96%, lo que indica que la enzima Nitrato reductasa es más afín al molibdato que la enzima FDH (252).

El Vanadio es un potente inhibidor de la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de Escherichia coli, Mg^{2+} -ATPasa de Sacharomyces cerevisiae y de la ATPasa de Neurospora crassa. La actividad de las Ribonucleasas y las Fosfatasa ácida y alcalina se inhiben en presencia de Vanadato (63,182). Bowman y Slayman sugieren que el vanadio puede actuar como análogo del fosfato (17).

Algunos informes indican que ciertos microorganismos poseen resistencia al molibdeno, tungsteno y vanadio, pero aún no se identifican los géneros microbianos ni los mecanismos que llevan a cabo los microorganismos para resistir altas concentraciones de este metal (229).

4.8 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL PLOMO.

El Plomo se encuentra distribuido en la atmósfera , tierra , océanos , ríos , lagos , y lagunas; se puede absorber y acumular en muchos tejidos animales y vegetales(27, 250,269).

De todos los metales pesados que se conocen desde la antigüedad , el plomo es el único que no tiene ninguna aplicación en la terapéutica moderna. El uso de los compuestos del plomo como astringentes ha pasado por períodos de aceptación y de rechazo en los últimos dos siglos . Hoy, el plomo es con razón ,materia no grata en la terapéutica y solo tiene interes en la toxicología(80).

En la Ciudad de México el plomo proviene fundamentalmente del Tetraetilo de Plomo ,metal usado en el Diesel como antidetonante . Hasta 1982 , el nivel detectado de plomo en el Distrito Federal fue de 2.4 g/m³ en un período de 3 meses. Actualmente estos niveles se rebazan llegando a cantidades alarmantes (27,269).

Quando el plomo se ingiere o se inhala, se acumula en la sangre , huesos y tejidos suaves ; como no se excreta rápidamente puede afectar los riñones , el sistema nervioso y la producción de sangre . Si la ingesta es en altas concentraciones , se pueden presentar problemas neurológicos , retardo mental y desordenes de conducta.

Los niños son especialmente susceptibles a los daños que se provocan en el sistema nervioso central(80,250).

El plomo , como los demás metales pesados , tienen afinidad por el azufre , y se combinan con los grupos sulfhidrilos (-SH) de la cisteína, puede formar complejos menos estables con otros aminoácidos de la misma clase . Se cree que produce sus efectos mediante la inhibición del grupo -SH. El hecho de que el metal se deposita en los huesos demuestra que el plomo tiene otras afinidades in vivo , y sería un error pasar por alto sus interacciones con los grupos carboxilo , fosforilo y quizá otros , al considerar sus posibles mecanismos de acción . Cuando el plomo se encuentra en concentración de 10^{-3} a 10^{-4} M , puede inhibir algunas enzimas que tienen grupos -SH como : Fosfatasa alcalina , Glutamato deshidrogenasa , Transaminasa glutámico-oxaloacética, Transaminasa Glutámico pirúvica , Lactato Deshidrogenasa , Sorbitol deshidrogenasa , Acetil colinesterasa , Fosfatasa ácida, d-Ala deshidrogenasa , Aminopeptidasa, ATPasa, Anhidrasa carbónica , Bifosforasa , Fructosa 1,6 difosfatasa y Succinato deshidrogenasa. El metal afecta la estructura de las mitocondrias y con esto el proceso de oxidación celular , forma complejos con los grupos fosfato de los nucleótidos y ácidos nucleicos , además cataliza la hidrólisis del Trifosfato de adenosina (ATP) (249) .

El plomo inorgánico no atraviesa la piel normal , pero puede introducirse a través de abrasiones , en cambio , los compuestos orgánicos , como el Tetraetil plomo, atraviesa rápidamente la piel intacta .

En Escherichia coli se observa que el plomo (Pb^{2+}) , inhibe la incorporación de la leucina al

Acido Ribonucleico (RNA_x). El Tetraetilo de plomo inhibe la incorporación de la glicina y glutamato, además de la síntesis de proteínas. Estudios que se realizan con hamsters indican que el plomo incrementa las malformaciones de fetos (196). En humanos produce trastornos hemáticos como: Anemia, Inhibición de la incorporación del fierro y disminución de la fragilidad osmótica. En adultos y animales que sufren intoxicación por plomo aumenta la hemoglobina fetal.

El Plomo atraviesa la barrera placentaria, en estas circunstancias puede causar anomalías congénitas en animales, aún no se tienen informes de teratogénesis en el ser humano. Sin embargo, hay efectos perjudiciales en el feto (269).

El exceso de compuestos inorgánicos y orgánicos del plomo son tóxicos para los microorganismos. Los compuestos alquílicos se pueden biotransformar por los microorganismos. Los estudios realizados indican que el tetraetilo de plomo es más tóxico que el plomo trietilico y el tetrafenilo de plomo. El cambio de un grupo arilo o grupos hidroxilo reduce su toxicidad (80, 249).

Aún no se comprueba intoxicación patente por contaminación ambiental, pero la concentración corporal de plomo en algunas personas que trabajan en fundidoras o bien, viven cerca de carreteras, resulta excesivamente elevada.

4 . 8 . 1 Metilación del Plomo .

El plomo es uno de los metales , que el hombre introduce con mayor frecuencia al medio ambiente , como consecuencia se encuentra en aguas naturales , donde precipita y se deposita en los sedimentos .

Los compuestos del plomo que se encuentran en los sedimentos de ríos , se pueden transformar por microorganismos , a compuestos volátiles como el Tetrametil plomo ($(CH_3)_4Pb$) (207) . Actualmente Wong y Chau realizan estudios sobre la metilación del plomo en sedimentos de los lagos Onario, St Clair y Erie en Canada, Los investigadores toman muestras de sedimento (50grs) y de agua (150 ml) . Para estimular el crecimiento bacteriano , a las muestras se les adiciona caldo nutritivo (0.5 %) , glucosa (0.1%) y se burbujea nitrógeno para crear condiciones de anaerobiosis , los cultivos se incuban a una temperatura de 20 C durante 2 semanas . En los cultivos microbianos se detecta por espectrofotometría de absorción atómica y cromatografía de gases , la presencia de dos gases volátiles que se identifican como Tetrametilen plomo $(CH_3)_4Pb$ y acetato de Trimetilen plomo $(CH_3)_3PbOAc$. Si a las muestras se les agrega nitrato ó cloruro de plomo , disminuye la concentración de los gases. (262) .

Entre las bacterias aisladas e identificadas por Wong y Chau se encuentran :

Pseudomonas sp.

Alcaligenes sp.

Acinetobacter sp.

Flavobacterium sp. y

Aeromonas sp.

Durante esta investigación se comprueba que al agregar al medio de cultivo bacteriano Acetato de trimetilen plomo (10 mg), después de una semana de incubación, se detecta cierta concentración de Tetrametilen plomo (125 g), lo que comprueba que los microorganismos pueden llevar a cabo esta transformación (262).

Aun no se tienen informes sobre el mecanismo que realizan los microorganismos para transformar el plomo inorgánico en compuestos orgánicos volátiles. Recientemente Jarvie y col. sugieren que el acetato de trimetilen plomo juega un papel importante en esta biotransformación, se sugiere que este compuesto se requiere para que se lleve a cabo la metilación del plomo (11,207).

El proceso de metilación del plomo, es difícil, porque se requiere de condiciones físicas, químicas y biológicas específicas para su realización.

4. 8. 2. Inmovilización microbiana del Plomo.

Los datos en la literatura indican que algunos microorganismos son capaces de inmovilizar al plomo inorgánico cuando penetra en la célula (en el citoplasma). Tornabene realiza estudios con Micrococcus luteus y Azotobacter sp. y encuentra que cuando estas bacterias se desarrollan en un medio de cultivo con Bromuro de Plomo ($PbBr_2$ 2.2 mg/ml),

las bacterias inmovilizan 3.1×10^2 mg de plomo por gramo de peso seco. Se sugiere, que el plomo pasa a través de la membrana o pared celular y se inmoviliza en el citoplasma (149).

Edwards, determina en que fracción celular de M. luteus y Azotobacter sp. se inmoviliza el plomo, para lo cual inoculan los microorganismos en caldo Tripticasa Soya, la sal de plomo se añade a través de una membrana de diálisis por contacto directo con las células. Los cultivos se incuban a una temperatura de 25 C con agitación. Cuando las células se encuentran en fase estacionaria de crecimiento, los cultivos se centrifugan y se lavan con una solución de sales que contiene por litro de agua destilada: Cloruro de Sodio (9 g), Sulfato de Magnesio (0.25 g), Cloruro de Manganeso (1.8 mg), Sulfato de Cobre (0.08 mg) y Cloruro Férrico (0.005 mg). El paquete celular se resuspende en una solución que contiene: solución amortiguadora Tris (Hidroxiamino etano 33 mM) Sacarosa (0.06 M), lisozima (13.3 mg/ml), ácido etilendiamino tetacético (5.32 mg/ml). Posteriormente se centrifuga con el objeto de obtener fracciones separadas de pared celular, membrana y citoplasma. De la fracción citoplásmica se separa por centrifugación la membrana celular. Se analiza la cantidad de plomo en cada fracción celular por análisis de espectrometría de absorción atómica. Los resultados se presentan en la tabla No. 27.

Tabla No.27 Distribución del plomo en las Fracciones celulares .

Fracción Celular	Concentración de Plomo			
	<u>Micrococcus luteus</u>		<u>Azotobacter sp.</u>	
	mg	%	mg	%
Pared celular	111	9.5	11,505	37.6
Membrana celular	1,048	89.8	18,833	61.5
Citoplasma	8	0.7	273	0.9

En la tabla anterior se observa una mayor concentración de plomo en la membrana y pared celular de Azotobacter sp. y Micrococcus luteus. Estos resultados indican que el sistema microbiano esta altamente capacitado para acumular plomo inorgánico e inmovilizarlo, lo cual se asocia a la membrana celular y no a la fracción citoplásmica. La acumulación e inmovilización del plomo por sistemas microbianos es de gran importancia en sistemas acuáticos, es decir, peces y moluscos [58].

4.8.3 Plásmidos que confieren resistencia al plomo .

Existen evidencias de que algunos plásmidos de Staphylococcus aureus confieren resistencia a compuestos inorgánicos de plomo como los siguientes plásmidos : P^b , P_{ero-3} , $B...ero^{rb}$, $Bp-26ero^r$, $Bp-ero-27$. Aun no se tienen informes a cerca de la fisiología, química ó regulación de este proceso, ni tampoco si la resistencia de los microorganismos al plomo involucre su transformación química [229].

4.9 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL ESTAÑO.

El Estaño es uno de los primeros metales que utiliza el hombre para hacer sus herramientas de trabajo. En los últimos años el estaño se usa como protector de revestimientos de acero, soldaduras, metales y algunas aleaciones. Los compuestos orgánicos que contienen estaño se usan como estabilizadores del plástico, Cloruro de polivinil y para la producción de insecticidas y fungicidas. La mayoría de estos compuestos se introducen en el medio ambiente a través de un proceso químico-biológico (263).

Los compuestos orgánicos del estaño son tóxicos para Eucariotes y Procariotes. Algunos estudios señalan que estos compuestos pueden distribuirse, transformarse o transportarse mediante microorganismos. Estas biotransformaciones juegan un papel muy importante en el medio ambiente ya que de esta manera el estaño se transporta o moviliza en el ecosistema (85).

Recientemente se comprueba en la Bahía de Chesapeak, que la microflora puede transformar el estaño inorgánico en compuestos orgánicos. Uno de los microorganismos capaces de metilar el estaño y transformarlo en Tetrametilo de estaño (CH_3)₄Sn, (CH_3)₃SnH y (CH_3)₂SnH₂ es Pseudomonas sp. También se tienen informes de que los microorganismos que habitan en los sedimentos de la Bahía de Chesapeake son capaces de transformar el estaño (II) en estaño (IV) y posteriormente metilarlo. Bacterias que se aíslan de muestras de sedimentos de la Bahía de San Francisco pueden convertir (CH_3)₃SnOH a Tetrametilo de estaño en condiciones anaerobias.

Los compuestos orgánicos del estaño son potentes inhibidores de cadena respiratoria y como consecuencia de la fosforilación oxidativa [223], además catalizan el transporte de los iones hidroxilo (OH^-) y cloruro (Cl^-) a través de la membrana mitocondrial. En Escherichia coli se observa que el Cloruro de tributil estaño inhibe el transporte de Prolina y Glutamina acumulándose intracelularmente [216].

Aún no existen informes sobre el mecanismo de transformación del estaño inorgánico a compuestos orgánicos. Actualmente se estudian los microorganismos que son resistentes al estaño y sus derivados, para determinar si la resistencia y las transformaciones se confieren por medio de plásmidos o transposones.

4.10 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL ANTIMONIO.

El antimonio guarda semejanza química y biológica con el arsénico . En la antigüedad se utiliza como medicamento y cosmético , y a principios del siglo XX , se introduce el uso de compuestos orgánicos del antimonio como parasiticidas , (in para el cual siguen siendo útiles 80).

El antimonio trivalente forma rápidamente tioantimonitos con los grupos SH de los constituyentes celulares y el pentavalente forma tioantimoniatos , pero no se sabe si la reacción se verifica también in vivo .

Aunque se tiene la información de que el mecanismo de acción de los antimoniales es su reacción con los grupos SH , esta suposición no se demuestra aún . Los antimoniales (3⁺) inhiben rápidamente algunas enzimas , como la Deshidrogenasa pirúvica .

En Estados Unidos , es poco frecuente el envenenamiento con antimonio , ya que este metal se usa poco en la medicina y en la industria . En países en desarrollo , los antimoniales pentavalentes se usan en el tratamiento de la Leishmaniasis , y los trivalentes se usan en infecciones Helmínticas y en el tratamiento del Granuloma inguinal (80,184).

4.10.1 Oxidación y Metilación del Antimonio .

Existe poca información sobre la transformación del antimonio , pero hay evidencia que indican que un nuevo género bacteriano Stibiobacter sernarmonii además de Thiobacillus ferroxidans son capaces de oxidar el antimonio (3⁺) . Aparentemente estos microorganismos utilizan la reacción para la obtención de energía , pero aún no se sabe cual es el mecanis-

mo de oxidación del antimonio (229).

Parris sugiere que el antimonio puede metilarse biológicamente , es decir , por medio de microorganismos , pero aún no se demuestra esta transformación, ni se tienen informes de que microorganismos son capaces de realizar la metilación.(184).

4.10.2 Plásmidos que Codifican Resistencia al Antimonio.

Estudios que realiza Silver y Budd, indican que la resistencia de los microorganismos al antimonio trivalente se codifica por medio de plásmidos. En Staphylococcus aureus y Escherichia coli el operón que gobierna la resistencia al arsenito y arsenato , también promueve resistencia al antimonio y consta de 200 pares de bases.

Evidencias bibliográficas indican que en el plásmido p1258 , el gene que codifica resistencia al antimonio está separado de los genes de arsenito y arsenato.

Summers y colaboradores , postulan que las bacterias que adquieren resistencia al antimonio excretan un agente quelante muy efectivo , capaz de atrapar el metal presente en el medio, o bien , que el microorganismo tenga un sistema excretor de este metal(224). La resistencia al antimonio se relaciona con la resistencia al cadmio, arsenato, y arsenito , pero no con su transformación.(229).

5. MECANISMOS DE TRANSFORMACION DE LOS METALOIDES Y MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS

Los metaloides son elementos químicos que poseen cierto carácter metálico, es decir, comparten algunas propiedades con los metales. Estos elementos reaccionan de manera similar como los metales de transición y tienen semejantes propiedades toxicológicas y farmacológicas (138,263).

Entre los metaloides, el arsénico, telurio y selenio, son de gran importancia en la ecología, debido a que frecuentemente se encuentran contaminando el ambiente y ocasionan grandes problemas en la flora y fauna de las zonas afectadas, así como para la salud pública. Al igual que los metales pesados, son transformados por microorganismos en compuestos con menor toxicidad, lo que constituye un mecanismo de resistencia y de desintoxicación para los microorganismos, que puede ser utilizado en el control de la contaminación ambiental (65,68,269).

La mayoría de los investigadores que estudian los mecanismos de transformación de los metales pesados vía microbiana, incluyen en sus estudios al arsénico, telurio y selenio [65,68,69,214,229,263].

5.1 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL ARSENICO Y SUS DERIVADOS.

El arsénico es un elemento importante en la naturaleza y biodegradable por microorganismos, puede encontrarse en agua salada, dulce, sedimentos, rocas y suelo [20,65].

El arsénico se emplea como agente terapéutico y tóxico en la medicina desde el año 1000 A.C. Desde el año 910 se usa como agente terapéutico contra Trypanosoma cruzi y Spirochaeta spiralis, y hasta 1960 se demuestra que el arsénico es carcinogénico para los animales y el hombre. Actualmente este metal y sus derivados, se usan para la fabricación de pigmentos, insecticidas, herbicidas, aleaciones y como agente químico [20,80,92,138].

Este metal comunmente se encuentra contaminando el medio acuático y dependiendo de las condiciones del sistema (pH, ΔE, ΔG, y T), el arsénico tiene 4 estados de oxidación (5+, 3+, 0, 3-), aunque las formas más comunes son el arsenito y arsenato. El arsenito reacciona con los grupos sulfhidrilos (residuos de cisteína) presentes en las proteínas, además, es un inhibidor específico de las enzimas Piruvato deshidrogenasa y α-Cetoglutarato deshidrogenasa. El arsenato no reacciona con los grupos sulfhidrilos, pero es análogo del fosfa-

fato inorgánico e inhibe enzimas como las cinasas utilizadas durante la glucólisis (80,229).

El arsénico presente en muestras de agua (de desecho , ríos , lagos y mar) y sedimentos comunmente se determina por métodos colorimétricos, en los que se usan complejos coloridos como Dietilditio carbamida o molibdeno. Pequeñas concentraciones se detectan por polarografía , espectroscopia de absorción atómica y de emisión. Los diferentes estados de oxidación del metal se detectan por técnicas colorimétricas y polarográficas , y las formas metiladas por precipitación de sales , cromatografía y espectroscopia de masas.

La contaminación con arsénico y sus derivados se introduce al medio ambiente a través de pesticidas arsenicales (metil-arsenato de sodio y arsenato de calcio y plomo) que se aplican en grandes áreas , afectando ambientes acuáticos y terrestres cercanos (68,269).

La presencia de este metal y sus derivados en el medio ambiente es de importancia por que amenaza a organismos acuáticos y la salud de los humanos , debido a que algunos de los alimentos que se consumen en países orientales como: pescados , mariscos (como el camarón y la langosta) y algas , contienen concentraciones considerables de arsénico (0.05 - 50 mg/kg peso seco) . En animales superiores el metal se puede encontrar en concentraciones elevadas en forma de trimetil arsina (2000 mg/Kg) . Los informes indican que el arsenito es tóxico para los organismos a una concentración de 1.0 a 45 mg/l y el arsenato a una concentración de 230 mg/l lo que demuestra que el primero es más tóxico en comparación con el segundo (65,269).

La distribución del arsénito puede ser afectada por diversos organismos anaerobios y aerobios, que lo pueden acumular, transportar y transformar. La transformación se puede realizar en presencia o ausencia de microorganismos (65)

5.1.1 Ciclo del Arsénico en la Naturaleza

El ciclo del arsénico en la naturaleza se lleva a cabo mediante 5 reacciones, las cuales se enumeran a continuación: oxidación del arsénito, reducción del arsenato, adsorción del arsenato, precipitación y metilación del arsénito y arsenato (Fig.No. 38)

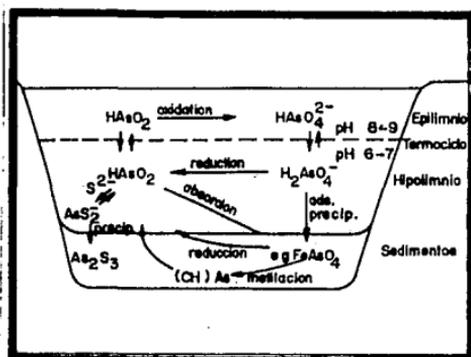


Fig.No. 38 Ciclo del Arsénico en la Naturaleza

En el esquema anterior se observa que en condiciones aerobias, las formas reducidas del arsénico se oxidan a arsenato, el cual reacciona con el hidróxido férrico, precipitando a arsenato férrico, que puede ser metilado o

reducido. La reducción del arsenato a arsenito se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis, que ocurre cuando disminuye la turbulencia y el arsenito pasa a través del termociclo y precipita en forma de sulfuro de arsénico. Esta precipitación depende de la concentración de azufre en el medio. La adsorción del arsénico se promueve cuando los sedimentos son removidos, el ión férrico se reduce y los iones arsenito y arsenato se estabilizan formando sulfuro de arsénico o arsénico metálico. El arsenito y arsenato son metilados en los sedimentos (65).

5.1.2 Oxidación del Arsenito

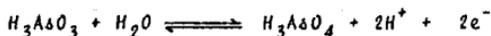
Recientemente H.H. Green aísla de materia fecal de ganado, un microorganismo capaz de desarrollarse en un medio que contiene Trióxido de arsénico al 1% (As_2O_3) y lo identifica como Bacillus arsenoxydans. Posteriormente A.W. Turner aísla 5 cepas heterótrofas de materia fecal de ganado porcino y determina su capacidad de oxidar el arsenito. El investigador estudia el mecanismo enzimático de la oxidación del arsenito. Para este propósito Turner aísla a los microorganismos en el medio de Citrato de Koser's que contiene arsenito de sodio (0.02M) e incuba en condiciones aerobias a una temperatura de 40°C. Al inicio, observa un período de adaptación "fase lag", después de la cual inicia la actividad oxidativa. Cuando las condiciones de crecimiento son adecuadas (pH 6, Temperatura 40°C, agitación continua), los microorganismos son capaces de oxidar alrededor de 90 μ M de arsenito por hora. En presencia de algunas sustancias químicas y un pH de 3 - 11 se inhibe la capacidad oxidativa. En la Tabla No. 28 se muestran las sustancias inorgánicas que

inhiben la oxidación del arsenito.

Tabla No. 28 Sustancias inorgánicas que inhiben total o parcialmente la oxidación del arsenito .		
sustancia	Concentración (M)	Inhibición de la oxidación del arsenito (%)
Azida	-	100
Cianuro	0.001	100
	0.003	50
Monóxido de Carbono	-	50
Uretano	0.1	-
Iodoacetato	0.01	-
Fluoruro	0.01	21
	0.1	67
Pirofosfato	0.02	10

Los resultados de la tabla anterior muestran que en presencia de cianuro, azida y monóxido de carbono se inhibe la oxidación del arsenito. Estos resultados sugieren que la Citocromo oxidasa tiene un papel esencial en la oxidación del arsenito. Durante los estudios, los investigadores no observan inhibición de la oxidación del arsenito en presencia de Iodoacetato y uretano, pero si parcial cuando se agregan fluoruro y pirofosfato, lo que indica la participación de ciertos compuestos en esta transformación.

Algunos investigadores señalan que los microorganismos capaces de oxidar el arsenito, requieren de la enzima Arsenito deshidrogenasa, que se encuentra asociada a un sistema de citocromos. Durante la reacción de oxidación vía arsenito deshidrogenasa se generan 2 electrones, que se transfieren a los citocromos c, a y de ahí al oxígeno atmosférico vía citocromo oxidasa (65, 245).



No existen evidencias que demuestren que las bacterias resistentes al arsenito, obtengan y utilicen energía de la oxidación del compuesto antes mencionado

Recientemente Shirley E. Phillips y

Mary L. Taylor estudian la capacidad de Alcaligenes faecalis de oxidar al arsenito. Para demostrarlo, los investigadores utilizan muestras de aguas residuales a las que se añade arsenito de sodio (1mg/ml) y se incuban a 22°C en agitación durante 3 semanas. El cultivo bacteriano se centrifuga y el sobrenadante obtenido se analiza para detectar la presencia de arsenito y arsenato por el método de plata-dietilditio-carbamida, el paquete celular se inocula en medio de Herchey que contiene: glucosa al 0.1%, agar (1.5%), arsenato de sodio (0.02 M) y extracto de levadura (0.3%), el cultivo bacteriano se incuba a una temperatura de 30°C durante 2 días (187).

Para observar la capacidad de Alcaligenes faecalis YE56 de oxidar el arsenito, los investigadores antes mencionados inoculan al microorganismo en el medio sintético CDM constituido por: $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ (1.5 g/l), KH_2PO_4 (1.0 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.4 g/l), 10 ml de suplemento vitamínico I (hidrocloruro de piridoxal 0.025 g/l, tiamina 0.1 g/l, pantotenato de calcio 0.1 g/l, riboflavina 0.1 g/l, niacina 0.1 g/l, p-aminobenzoato 0.05 g/l, hidrocloruro de piridoxina 0.2 g/l y vitamina B₁₂ 200 g/l), 2 ml de suplemento vitamínico II (ácido fólico 25 mg y biotina 50 g en 200 ml de agua destilada), citrato de sodio (0.5 g/l), ar-

senito de sodio (0.02 M). El medio se ajusta a un pH de 6.8 - 7 con HCl o H_2SO_4 y se incuba a una temperatura de 30°C durante 3 días. Posteriormente las bacterias se resuspenden en solución amortiguadora Tris, con hidrocloreuro de sodio (0.05 M) y arsenito de sodio (0.02 M, pH 7.55). La suspensión celular se mantiene en agitación a una temperatura de 32°C, se toman alícuotas de 10 ml en un intervalo de tiempo determinado y se filtra utilizando equipo millipore. El filtrado obtenido se utiliza para realizar las siguientes pruebas:

- Determinación de arsénico total (arsenito y arsenato) por el método de plata dietil-ditiocarbamato (187).
- Determinación directa de arsenito por análisis volumétrico con Iodo (96).
- Determinación de arsenato por el método modificado de Fiskesubarow (60).

Phillips y Taylor demuestran que A. faecalis VE56 es capaz de oxidar el arsenito a arsenato. Los resultados del estudio se muestran en la Fig.No. 39.

En las gráficas anteriores se observa que la concentración del arsenito inicial es de 10 μ M/ml, la cual disminuye al incrementarse el tiempo y empieza a detectarse el arsenato. A las 6 horas de incubación, se agota el arsenito y el arsenato llega a una concentración máxima de 7.8 μ M/ml, que permanece constante después de 2 horas de incubación.

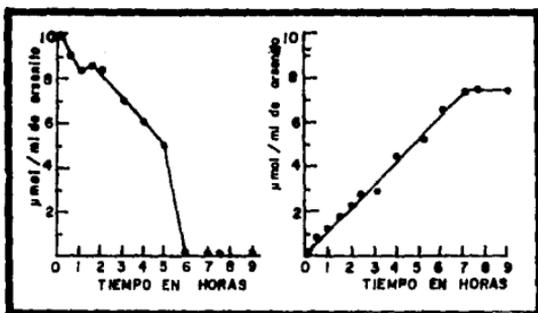


Fig. No.39 Tiempo en que tarda en desaparecer el arsenito y aparecer el arsenato en el medio de cultivo.

La oxidación del arsenito depende del pH y la concentración inicial presente en el medio de cultivo. Durante los estudios, se observa que al aumentar la concentración de arsenato disminuye el pH, debido a la naturaleza ácida del radical arsenato. En la Fig. No. 40 se comparan los resultados obtenidos del estudio.

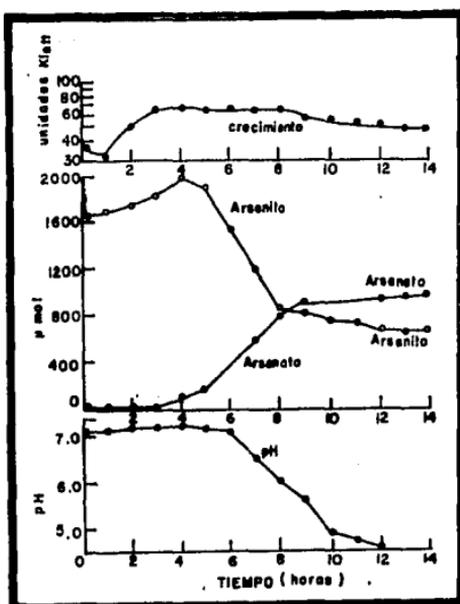


Fig.No. 40 Factores que influyen en la oxidación del arsenito (concentración de arsenito, pH, tiempo de incubación) en un cultivo de Alcaligenes faecalis.

En las figuras anteriores se observa que cuando el microorganismo se encuentra en la fase "lag" de crecimiento, se inicia la actividad oxidativa. A las 4 horas, el crecimiento bacteriano permanece constante y a las 6 horas la concentración de arsenito disminuye conforme aumenta la concentración de arsenato, en ese momento el pH del medio de cultivo comienza a decaer.

La oxidación del arsenito comienza al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, lo que sugiere que existe una relación entre la enzima responsable de la oxidación y la fase de crecimiento del microorganismo. Para demostrar lo dicho anteriormente, Phillips y Taylor, inoculan a Alcaligenes faecalis (en fase "log" de crecimiento) en medio CDH modificado (1g/ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/l de aminoácidos, 0.5 g/l de citrato de sodio, 2ml de suplemento vitamínico II y 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.0) suplementado con arsenito de sodio (0.02 M), se incuba a 37°C y se toman alicuotas del medio cada hora para medir densidad óptica a 660 nm. Las alicuotas se filtran (filtro millipore) y el filtrado obtenido se divide en 2 partes: una de ellas se usa para determinar concentración de arsenito, la otra se incuba en las mismas condiciones del cultivo original durante 3 horas. Finalmente se determina volumétrica-mente (por el método Iodométrico) la concentración de arsenito de la segunda alicuota. Los resultados del estudio se presentan en la Tabla No. 29 (187,245).

Tabla No. 29 Actividad de oxidación del arsenito intracelular y extracelular.				
Tiempo (h)	células/ml	densidad óptica	Concentración de arsenito en filtrados durante el tratamiento (%)	
			antes	después
0	3.64×10^8	0.28	100	-
1	3.91×10^8	0.37	83	100
2	3.60×10^8	0.42	47	58
3	3.87×10^8	0.50	0.5	0.5

Los datos de la tabla anterior indican que la actividad de oxidación del arsenito reside en el interior de la célula, debido a que no se presenta actividad oxidativa en los filtrados.

La oxidación del arsenito se lleva a cabo por una enzima y/o un aceptor de electrones (coenzima Q), que se forman cuando las células crecen en presencia del compuesto, esta transformación también se asocia a la permeabilidad de la membrana microbiana al arsenito (65). Estudios que realiza Turner indican que la enzima arsenito deshidrogenasa se encuentra asociada a los citocromos de cadena respiratoria. En condiciones de anaerobiosis los microorganismos, pueden utilizar nitratos como último aceptor de electrones para la oxidación de diversas fuentes de carbono, pero no para llevar a cabo la oxidación del arsenito (245). Estudios realizados con Alcaligenes faecalis, señalan que cuando el microorganismo se desarrolla en dos medios diferentes: caldo nitrato en presencia y ausencia de arsenito de sodio (0.02 M), en condiciones de anaerobiosis. No se observa crecimiento bacteriano, si el medio contiene caldo nitrato con arsenito, debido a que este compuesto inhibe la respiración anaerobia a nivel de transporte de electrones (187). Alcaligenes faecalis, es capaz de oxidar el arsenito solo cuando se encuentra en fase estacionaria de crecimiento, y se piensa que existe una inducción durante la fase "lag" de crecimiento.

Para que se efectue la oxidación del arsenito, no es necesario que el microorganismo se desarrolle en

concentraciones altas de arsenito (0.02 M) . Es posible que la habilidad de los microorganismos para oxidar el arsenito ocurra gracias a una mutación espontánea o por la transferencia de plásmidos R . Algunos microorganismos que poseen resistencia a compuestos del arsénico son capaces de llevar a cabo su transformación(187).

5.1.3 Reducción del Arsenato.

En medios acuáticos el arsénico ,generalmente se encuentra en forma de arsenito y arsenato. El arsenato presente en estos medio , puede ser transformado por microorganismos a arsenito(65).

Recientemente David J. Johnson, estudia la capacidad de la microflora de zonas acuáticas para reducir los iones arsenato . Para su estudio el investigador utiliza muestras de agua de mar de Sargasso , las cuales diluye 1:50 y enriquece con sacarosa al 4.1% , medio de Guillard's "x" y arsenato de sodio. Los cultivos microbianos se incuban en condiciones de aerobiosis a una temperatura de 20 a 22°C .Posteriormente se cuantifica espectrofotométricamente la concentración de arsenito , arsenato y fosfatos presentes en el medio(115).

Durante los estudios realizados por Johnson , se observa , que la reducción del arsenato , se lleva a cabo por bacterias que se encuentran en fase "Log" de crecimiento . A medida que el crecimiento celular se incrementa , disminuye la concentración de arsenato y fosfato presentes en el medio de cultivo y aumenta la de arsenato(Fig.No 41).

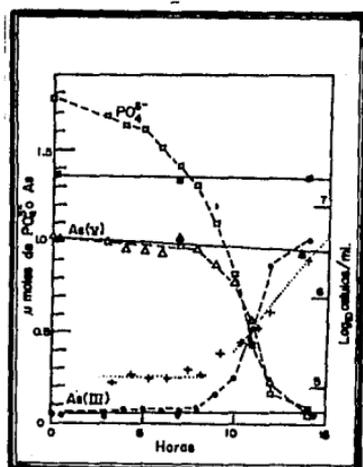


Fig.No. 41 Concentración de arsenato, arsenito y fosfato presentes en el medio de cultivo en función del tiempo. Fosfato, \square ; arsenato, \circ ; arsenito, Δ ; número de células, \times . Las líneas continuas representan los controles.

Los resultados que se presentan en la Fig.No.41 demuestran que los microorganismos llevan a cabo la reducción del arsenato. Se calcula que un cultivo microbiano lleva a cabo en 14 horas la reducción del arsenato, es decir, aproximadamente se reduce en 1 minuto 10^{-11} μ moles de arsenato/célula (115).

Algunos investigadores señalan, que una gran variedad de bacterias y algas marinas poseen la capacidad de reducir los iones arsenato a arsenito. Hasta ahora, solo se han identificado 2 géneros bacterianos capaces de realizar esta transformación: Veillonella alcaliscens y Micrococcus aerogenes (65,214).

5.1.4 Metilación de Compuestos Arsenicales

Gran cantidad de compuestos arsenicales se encuentran contaminando aire, agua y sedimentos (65, 269), afortunadamente algunos microorganismos poseen la capacidad de reducir, oxidar y metilar dichos compuestos en sustancias volátiles y de mayor estabilidad (58, 69, 263).

La metilación de los compuestos del arsénico es de gran importancia en la ecología, debido a que los compuestos metilados son de gran toxicidad para los seres humanos, como la dimetil arsina, el ácido dimetil arsónico $(\text{CH}_3)_2\text{AsOH}$ y el ácido metil arsónico $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})$, que se usan ampliamente como herbicidas (80, 269).

La producción de dimetil arsina y trimetil arsina a partir de arsenato, se estudia ampliamente con Scopulariopsis brevicalis. Al estudiar esta transformación, algunos investigadores proponen el mecanismo de transformación del arsenato para la obtención de los compuestos orgánicos del arsénico (Fig.No. 42) (32, 263).

Estudios que realizan diversos investigadores, señalan que Scopulariopsis brevicalis, Candida humicola, Rhodotorula rubra y Metanobacterium spp., son capaces de metilar el arsenato y arsenito, cuando se desarrollan en elevadas concentraciones de estas sustancias (32, 45, 147, 269).

El arsenito, ácido metil arsónico y el ácido dimetil arsónico son precursores de la síntesis de la dimetil arsina. Estos precursores se han logrado aislar de extractos celulares capaces de metabolizar el arsenato. Para demostrar que el último intermediario de la biosíntesis de la trimetil ar-

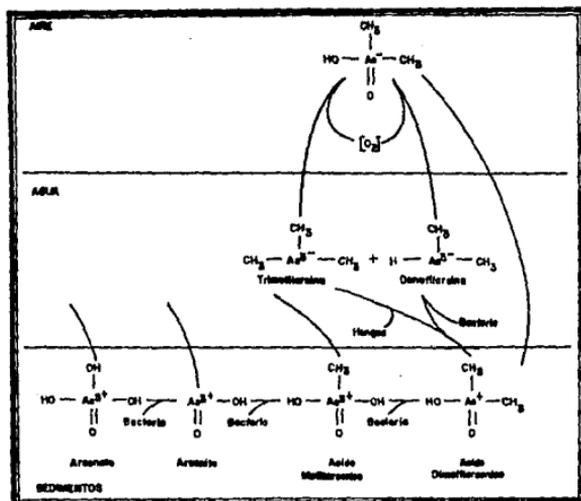


Fig. No. 42 Síntesis de la Trimetil arsina a partir Arsenato y Arsenito

sina es el óxido de trimetil arsina, Pickett y McBride, utilizan una cepa de *Candida humicola*, que aislan de aguas residuales domésticas. El microorganismo se inocula en un medio de cultivo que contiene: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.0 g), KH_2PO_4 (0.1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.05 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0018 g), tiamina (0.01 g), glucosa (10.0 g) en 1 litro de solución amortiguadora de ácido succínico-succinato de potasio (0.05 M, pH 5.0) y se incuba a 30°C durante 24 horas. Posteriormente las células (0.2 g de células peso seco/ml) se lavan con solución amortiguadora de acetato de sodio-ácido acético (pH 5.0) y se resuspenden en la misma solución amortiguadora. La suspensión celular obtenida (1 ml) se mezcla con óxido de trimetil arsina, se incuba a una temperatura de 30°C y se mide constantemente la producción de trimetil arsina por cromatogra-

fla gas-liquido . La reducción del óxido de trimetil arsina a metil arsina se muestra en la Fig.No. 43

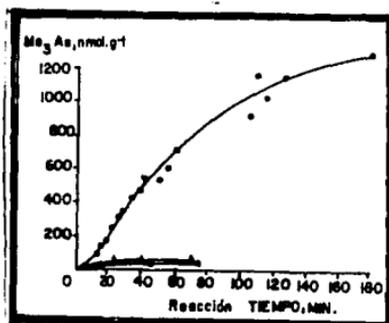


Fig.No. 43 Producción de Trimetil arsina a partir del óxido de trimetil arsina . Células completas, ● ; células sonificadas, ▲ ; células tratadas a 95°C durante 15 minutos, ▲ .

Durante el estudio Pickett y McBride , demuestran que el último intermediario de la síntesis de la trimetil arsina es el óxido de trimetil arsina y observan que:

- La agitación de las células durante 15 minutos a una temperatura de 95°C , destruye la habilidad de los microorganismos para sintetizar trimetil arsina(Fig.No. 43).
- La adición de glucosa , piruvato , citrato , succinato o NADH a extractos celulares no estimula la síntesis de trimetil arsina .
- La temperatura óptima para que se efectue la reducción del óxido de trimetil arsina es de 40°C. No se detecta actividad a las temperaturas de 4 y

45°C .

- Se observa una relación lineal entre el número de células y la síntesis de trimetil arsina (Fig.No. 44).

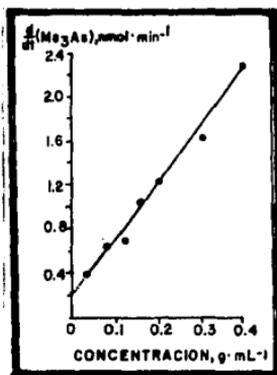


Fig.No. 44 Producción de Trimetil arsina en función de la concentración de células.

En la gráfica anterior se observa que la producción de trimetil arsina está en función de la concentración celular.

- El pH óptimo para que se lleve a cabo la reducción del óxido de trimetil arsina es a pH 5.1-5.2 (Fig.No. 45).

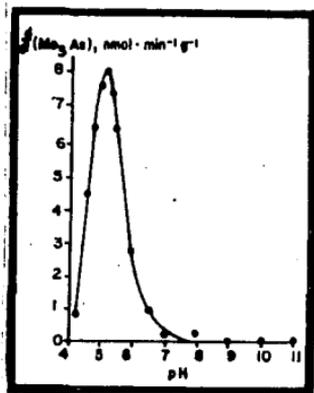


Fig.No. 45 Producción de Trimetil arsina en función del pH.

En la gráfica anterior se muestra la relación entre la producción de trimetil arsina y el pH. Se observa que la producción de trimetil arsina es de 3% a un pH de 7 y no hay síntesis a un pH de 9.

- La síntesis de trimetil arsina depende de la concentración de óxido de trimetil arsina. En la Fig.No.46 se observa que la síntesis de la trimetil arsina se incrementa linealmente hasta una concentración de 8mM de óxido de trimetil arsina, a partir de la cual permanece constante.

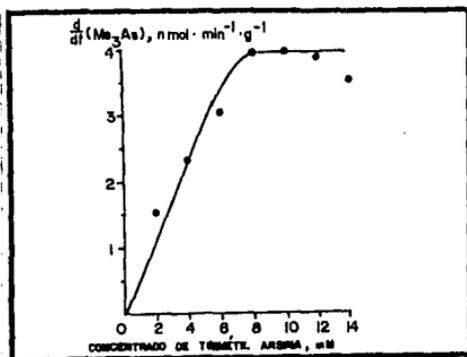


Fig.No. 46 Producción de Trimetil arsina en función de la concentración del óxido de trimetil arsina.

- La presencia de algunas sustancias químicas en el medio de cultivo inhiben la reducción del óxido de trimetil arsina (188) (Tabla No.30) .

Tabla No.30 Efecto de diversas sustancias químicas sobre la reducción del óxido de trimetil arsina.	
Sustancia química (10 mol/ml)	Inhibición de la producción de dimetil arsina (%).
control	100
NaNO ₃	106
Na ₂ HPO ₄	112
Na ₃ AsO ₃	0
Na ₃ AsO ₄	0
Na ₂ CH ₃ AsO ₃	12
Na(CH ₃) ₂ AsO ₂	98
NaSO ₄	100
Na ₂ SeO ₄	0
Na ₂ TeO ₄ (1 mol/ml)	2
Anaerobiosis	40

Los resultados de la Tabla anterior indican que el arsenito, arsenato, selenato y telurato, inhiben la reducción del óxido de trimetil arsina. En ausencia de oxígeno la producción de trimetil arsina se reduce a un 40% [18].

Pickett y McBride investigan la importancia del transporte de electrones, la transferencia de energía y la fosforilación oxidativa en la producción de dimetil arsina. Para demostrar lo anterior, los investigadores observan el efecto de algunas sustancias químicas que inhiben algunos de los procesos antes mencionados. En la Tabla No.31 se presentan los resultados que se obtienen de la investigación.

Tabla No.31 Efecto de inhibidores del transporte de electrones y fosforilación oxidativa sobre la producción de la trimetil arsina.		
Inhibidores	Concentración (mM)	Producción de dimetil arsina(%).
Control	-	100
Azida de sodio	10.0	0
Cianuro de sodio	10.0	0
2,4-Dinitrofenol	1.0	0
HOQNO(2-N-heptil-4, hidroxiquinoleína -N-óxido	0.5	22
Uretano	5.0	58
Antimicina A	0.01	20
Rotetona	0.05	23
CCC(carbonilamida, m-cloro fenil-hidrazona)	0.01	0
Oligomicina	0.1	18

Durante el estudio se observa que los inhibidores del transporte de electrones: HOQNO(óxido de 2-N-Heptil-4-Hidroxiquinoleína), Antimicina y Rotenona, inhiben un 80%

la producción de trimetil arsina y el uretano inhibe un 42%. El inhibidor de transferencia de energía CCCP (Carbonil cianuro-*m*-clorofenil-hidrazona) y el desacoplante de fosforilación oxidativa, inhiben un 100% la producción y la oligomicina; compuesto que bloquea la síntesis del ATP, inhibe un 82%. El efecto de los inhibidores del transporte de electrones y fosforilación oxidativa muestran la importancia del abastecimiento de electrones y de energía (ATP) en la producción de dimetil arsina [188].

La síntesis de dimetil arsina también se inhibe en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida [45].

Los estudios realizados con extractos celulares de Candida humicola, indican que el arsenato, dimetil arsenato y el óxido de trimetil arsina son precursores de la biosíntesis de trimetil arsina. El microorganismo lleva a cabo una ruta metabólica común para el metabolismo del arsenato, ácido metil arsénico, dimetil arsónico, dimetil arsina y trimetil arsina [184].

McBride y Wolfe realizan estudios sobre la síntesis de dimetil arsina con Metanobacterium sp. MoH. Los investigadores encuentran que el microorganismo requiere de la presencia de metil-donadores, ATP (Adenosin trifosfato) y arsenato para llevar a cabo la biosíntesis. Para el estudio, se requiere de extractos celulares de Metanobacterium sp. en solución amortiguadora TES (pH 7, 200 μ mol), ATP 9 10 μ m), (As)⁷⁴Na₂

HAsO_4 ($1 \mu\text{mol}$), metilcobalamina ($10 \mu\text{mol}$) e hidrógeno atmosférico. El extracto celular se incubó a una temperatura de 40°C y se mide la radioactividad presente en el medio (partículas radioactivas/min). Los resultados del estudio se presentan en la Fig.No. 47.

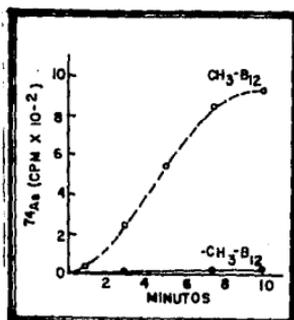


Fig.No. 47 Síntesis de la Dimetil arsina en extracto celular de Metanobacterium sp. MoH en presencia y ausencia de metilcobalamina.

En la gráfica anterior se observa que el microorganismo utiliza como donador de grupos metilos a la metilcobalamina para llevar a cabo la síntesis de trimetil arsina.

Los estudios realizados por Wolfe y colaboradores con Metanobacterium sp., demuestran que durante la síntesis de trimetil arsina, se detecta la presencia de Vitamina B_{12} (producto que se forma durante la desmetilación de la metilcobalamina), lo que indica que el grupo metilo se transfiere al arsenito para formar ácido metil arsónico. El exceso de arsenito puede bloquear la producción de ácido metil arsónico (147).

Otro microorganismo que lleva acabo la alquilación del arsenito es Desulfocvibrio vulgaris 8303. McBride y Wolfe realizan estudios con extractos celulares de este microorganismo y observan que la metilación del arsenito ,se lleva acabo en ausencia de metil donadores exógenos pero en presencia de metil-cobalamina (147,263).

Numerosas evidencias (65,69,265), indican que en los microorganismos hasta ahora estudiados:

- la síntesis de trimetil arsina solo se lleva acabo en presencia de metilcobalamina .
- durante la biosíntesis, el arsenato se reduce a arsenito , el cual se metila para formar ácido metil arsónico (Fig.No. 48).
- el ácido metil arsónico , se reduce y metila para formar el ácido dimetil arsónico , y se reduce formando dimetil arsina y finalmente trimetil arsina (Fig.No. 48).

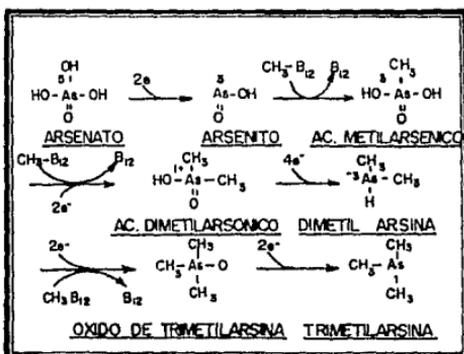


Fig.No. 48 Mecanismo de metilación del arsenato y arsenito.

Como resultado de la contaminación ambiental, frecuentemente se detectan elevadas concentraciones de compuestos arsenicales (arsenito, arsenato, ácido metil arsónico, ácido metil arsénico, dimetil arsina y trimetil arsina) en agua de mar, ríos y lagos. Andrae y Klumpp determinan en muestras de agua de mar, ríos y lagos, la concentración de algunos compuestos arsenicales utilizando el método de Andrae. Este método se fundamenta en la reacción de los compuestos arsenicales con el Borohidruro de sodio (pH 4-9) para formar hidruros, que se detectan por cromatografía de gases y absorción atómica. (7) (Tabla No. 32).

Tabla No. 32 Análisis de muestras de agua de mar, ríos y lagos de E.U.A. (ppb ^f 0.01).				
Procedencia de la muestra	As ³⁺	As ⁵⁺	ác. metil arsónico	ác. dimetil arsónico
Agua dulce				
Río Hillsborough	0.02	0.25	0.02	0.02
Río Withlacoochee	0.02	0.16	0.06	0.30
Agua alrededores				
Río Withlacoochee	0.02	0.27	0.11	0.20
Pond USF	0.79	0.96	0.05	0.15
Lago Echols, Tampa	2.74	0.41	0.11	0.32
Lago Magdalena, Tampa	0.89	0.49	0.22	0.15
Bahía Causeway	0.12	1.45	0.02	0.20
Bahía McKay	0.06	0.35	0.07	1.00

Los investigadores encuentran que en los ríos de Tampa, Florida, además de los lagos Echols y Magdalena, se detecta una elevada concentración de ácido metil arsónico y dimetil arsónico.

El método de Andre , se ha adaptado para determinar en orina la presencia de los ácidos metil arsénico y dimetil arsénico. Braman y Foreback, señalan que el arsénico ingerido por animales y humanos reacciona con la metilcobalamina-metionina obteniéndose los ácidos antes mencionados. En un estudio realizado por los investigadores , se detecta la presencia de compuestos arsenicales en orina de humanos de diferentes edades (Tabla No. 33).

Muestras sexo edad	As ³⁺		As ⁵⁺		ác. metil arsénico		ác. dimetil arsénico		total ppb
	ppb	%	ppb	%	ppb	%	ppb	%	
Masc. 28	0.1	-	0.84	8.1	0.61	5.9	8.9	86.5	10.4
Masc. 27	5.1	20	7.9	30	2.5	9.7	10.4	40.2	25.9
Masc. 42	0.5	-	2.4	7.8	2.4	8.1	25.2	84.0	30.0
Fem. 40	2.4	10	4.3	1.8	1.8	7.6	15.5	64.5	24.0
Promedio	1.9	8.4	3.9	17	18	8.0	15.0	66	22.5

La presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos del arsénico en la orina de seres humanos, acentúa la importancia de este metal y sus derivados como contaminantes del agua y alimentos, los cuales pueden llegar a causar intoxicaciones crónicas y agudas o bien la muerte de personas que ingieren agua y alimentos contaminados (269).

La dimetil arsina y trimetil arsina son compuestos volátiles , con cierta toxicidad. Ambos compuestos son oxidados a un compuesto con menor toxicidad , el ácido cacodílico (263). Informes recientes , señalan que el arsenito (As³⁺) es aproximadamente 25 veces más tóxico que el ácido dimetil ar-

sénico.

La metilación de los compuestos arsenicales es un mecanismo de desintoxicación para los microorganismos que se desarrollan en agua y sedimentos contaminados con estos compuestos. Para los animales y humanos también podría ser un mecanismo de desintoxicación (20).

5.1.5 Plásmidos que Codifican Resistencia al Arsenito y Arsenato.

Desde 1968, los informes indican que la resistencia que poseen ciertas bacterias a los compuestos del arsénico se promueve por medio de plásmidos. En los primeros estudios que se realizan con Staphylococcus aureus se observa que la resistencia al arsenito y arsenato se relaciona con la presencia de otros metales pesados (Hg^{2+} y Cd^{2+}), por esta razón Novick y Roth asocian 3 plásmidos con la resistencia a los compuestos arsenicales : pI258, pI1147, y pI524.

Plásmidos que codifican dicha resistencia se aíslan también de bacterias Gram negativas como : Escherichia coli, Shigella spp., Salmonella spp., Klebsiella pneumoniae y Proteus sp. (93,94,214,229).

En 1973 Hedges y Baumber reportan la existencia de un nuevo plásmido pR733, que codifica resistencia al arsenito, arsenato, estreptomycin y tetraciclina (92). En ese mismo año se realizan estudios con una colección de 50 plásmidos que codifican resistencia al mercurio, de los cuales de cada 5 plásmidos, uno promueve resistencia al arsenito y al arsenato. Como ejemplo se pueden citar los plásmidos R828, R773,

R8325 , y RN1058(229).

Recientemente Summers y colaboradores encuentran que los plásmidos que confieren resistencia al arsenato se clasifican dentro de los grupos de incompatibilidad FII, N y H₂(212). En la Tabla No. 34 se presenta la lista de los plásmidos que codifican resistencia al arsenato y arsenito, hasta ahora identificados.

Tabla No. 34 Plásmidos que codifican resistencia al arsenito y arsenato.			
Plásmido	Fenotipo	Bacteria hospedadora	Referencia
R733	ProMetAsaAsiTcAt	<u>Escherichia coli</u>	92, 152
R386	FCoLV2AsaAsi	<u>Escherichia coli</u>	92
R455	AsaAsiCmTc	<u>Escherichia coli</u>	152, 170
1524	PenHgrAsaAsi	<u>Staphylococcus aureus</u>	213
11147	PenAsaAsi	<u>Staphylococcus aureus</u>	172
1258	AsaAsi	<u>Staphylococcus aureus</u>	172

Los experimentos de recombinación, delección y clonación con algunos plásmidos de Staphylococcus aureus (p1258, Ψ , p11147, p1524) y Escherichia coli (R733, R386), demuestran que los genes que codifican resistencia al arsenito y arsenato se encuentran en el mismo operón, que consta de 200 pares de bases (Fig.No. 49)

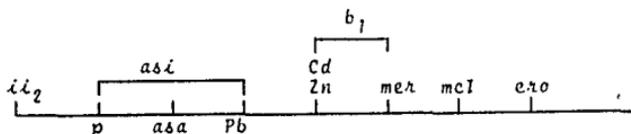


Fig.No. 49 Mapa tentativo del plásmido Ψ de Staphylococcus aureus

En la Fig.No. 49 se muestra un fragmento del mapa genético del plásmido , en el se observa que el gene que codifica resistencia al arsenito es diferente al del arsenato [173].

Recientemente se aísla de *Staphylococcus aureus* , el plásmido pR585 que confiere resistencia al arsenato , y se observa que cuando el microorganismo porta el plásmido se llevan a cabo cambios fisiológicos y bioquímicos en las bacterias (8). Algunos investigadores indican que los microorganismos que hospedan plásmidos que codifican resistencia al arsenito y arsenato , posiblemente sufren algún cambio en la naturaleza de algún receptor de membrana alterándose la permeabilidad de la membrana celular y la afinidad al arsenito (8, 214, 229).

Arima y Beppud estudian los cambios fisiológicos que se presentan en *Pseudomonas pseudomallei* (asa⁺, asi⁺) en presencia de diferentes concentraciones de arsenito de sodio (10^{-3} , 5×10^{-3} , 10^{-2} , 3×10^{-2} M). Los investigadores observan que al incrementar la concentración de arsenito de sodio , el crecimiento bacteriano disminuye (Fig.No. 50).

Posteriormente los cultivos bacterianos se reinoculan en un medio de cultivo con arsenito de sodio (10^{-2}), y se mide la densidad óptica cada hora durante un tiempo determinado. Los resultados se observan en la Fig.No. 51

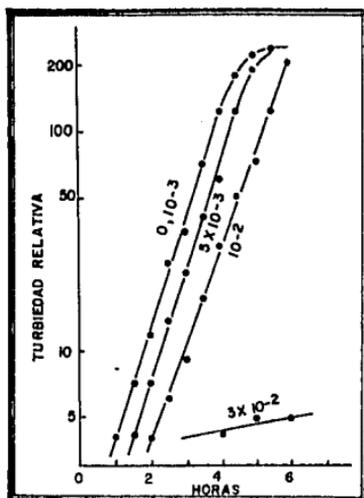


Fig. No. 50 Efecto de diferentes concentraciones de arsenito sobre el crecimiento de *Ps. pseudomallei*. El número indica la conc. de arsenito (M).

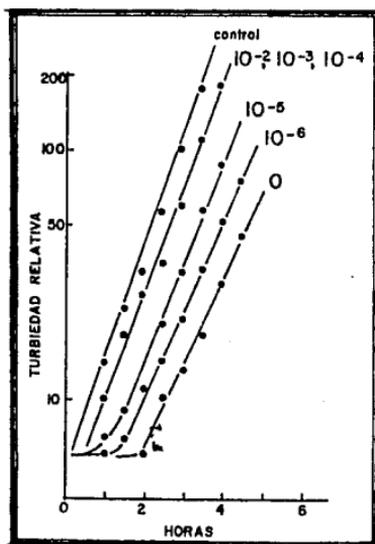


Fig. No. 51 Efecto del arsenito (10^{-2}) sobre el crecimiento de *Pseudomonas pseudomallei* (asa, asi). 186

Durante los estudios, se observa que cuando el microorganismo se desarrolla previamente en presencia de arsenito de sodio (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} M) no se presenta fase de adaptación, pero si el microorganismo se desarrolla en concentraciones menores o en ausencia del compuesto antes mencionado, la presenta.

Beppud y Arima realizan estudios con microorganismos sensibles y resistentes al arsenito de sodio. Ambos investigadores concluyen:

- en células sensibles y resistentes, la actividad de la enzima α -Cetoglutarato deshidrogenasa requiere de la Coenzima A y se inhibe en presencia de arsenito de sodio.
- en células resistentes al arsenito (10^{-2}), es menor la cantidad de ácido lipídico y compuestos con grupos sulfhidrilos (cisteína) (9,190).
- los microorganismos resistentes presentan una disminución en la permeabilidad de la membrana celular (214).

Estudios posteriores demuestran que la resistencia de los microorganismos al arsenito, se debe a la modificación de la permeabilidad de la membrana celular. Beppud observa que cuando inocula Pseudomonas pseudomallei (asa^{-} , asi^{-}) en un medio de cultivo con arsénico radioactivo (As^{76} , 10^{-4} M), disminuye notablemente la radioactividad presente en el medio de cultivo, lo que indica que los microorganismos incorporan el se-

lenito .Los resultados anteriores no se presentan cuando el microorganismo es resistente al arsenito (Fig.No. 52).

Simultaneamente se realizan estudios para medir la cantidad de arsenito radioactivo acumulado intracelularmente en bacterias tanto sensibles como resistentes . Ambos cultivos bacterianos se lavan con agua destilada para remover el arsenito extracelular , posteriormente se sonica (durante 10 min) un gramo de bacterias (peso seco), se resuspende en 10 ml de solución amortiguadora Tris ($10^{-2}M$, pH7) con cloruro de magnesio. Finalmente se mide la radioactividad (Fig.No. 52).

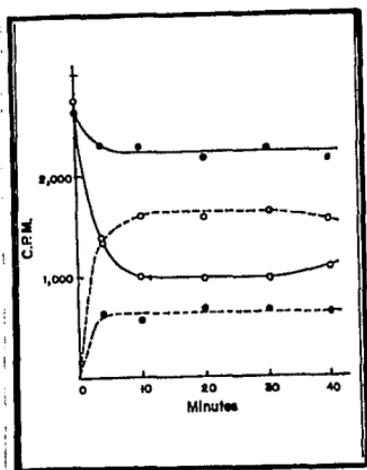


Fig.No. 52 Incorporación del arsenito en microorganismos sensibles (o) y resistentes (•). La línea continua indica la radioactividad en los medios de cultivos y la línea discontinua la cantidad de arsenito que se incorpora al microorganismo.

Durante el estudio se demuestra que la incorporación del arsenito es mayor en células sensibles que en resistentes, y la radioactividad en el medio de cultivo de los microorganismos sensibles es menor. La incorporación del arsenito depende de su concentración externa.

Algunos investigadores señalan que compuestos como el 2,4-Dinitrofenol ($5 \times 10^{-3} M$) y la azida de sodio (10^{-2}) no inhiben la incorporación del arsenito, lo que no sucede en presencia de Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB, $100 \mu g/ml$), que causa una alteración en la permeabilidad de la membrana celular (69, 212, 214).

Los informes señalan que la resistencia al arsenito y arsenato en microorganismos, tales como: Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Azotobacter sp., Alcaligenes faecalis, Bacillus arsenoxydans, Achromobacter arsenoxydans y Pseudomonas arsenoxydans quinque, se induce en presencia del compuesto. En estos microorganismos se detecta una disminución de la permeabilidad de la membrana celular (147), y cambios en el transporte de los iones a través de la membrana celular (212, 213, 214).

Silver y Budd señalan que los microorganismos que hospedan plásmidos que codifican resistencia al arsenito son capaces de oxidarlo a arsenato, lo que se comprueba con Escherichia coli (pR973) y Staphylococcus aureus (p1258) (212).

Existen 2 posibles hipótesis sobre la resistencia al arsenito:

- Los plásmidos codifican la síntesis de proteínas que modifican la permeabilidad de la membrana celular ,bloqueando la acumulación normal de arsenito y se inicia la excreción de estos iones al exterior.
- Los plásmidos codifican la síntesis de enzimas intracelulares modificadas .

El mismo sistema que emplea la célula para transportar los nutrientes ,se emplea para introducir a las sustancias tóxicas , al interior de la célula .El arsenato normalmente se acumula en la célula vía sistema de transporte de fosfato [8,212]. El arsenato es inhibidor competitivo del sistema de fosfato (Pst y Pit) (Fig.No. 53).

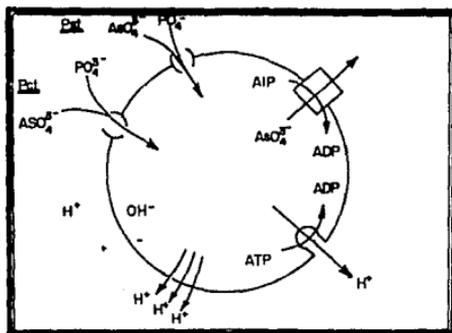


Fig.No. 53 Sistema de transporte y de excreción del arsenato.

En el esquema anterior se observa que el arsenato se transporta al interior de la célula por los sistemas de transporte de fosfato , es decir, Pst(Sistema de transporte

específico del fosfato) y Pit (sistema de transporte del fosfato). La excreción del arsenato es dependiente de la energía (213,214).

Willsky y Malamy estudian el efecto del arsenato en los sistemas de transporte del fosfato de Escherichia coli : Pit y Pst . Para los estudios , los investigadores inoculan varias cepas de Escherichia coli : GR5172 y U7 que son dependientes del sistema de transporte Pst ,GR5179 dependiente del sistema Pit y Gr2131 que posee ambos sistemas de transporte; en medio mínimo de sales WT (1mM de fosfato y fósforo) con arsenato radiactivo(As^{74} -arsenato), y posteriormente se mide la radioactividad intracelular(Fig.No 54).

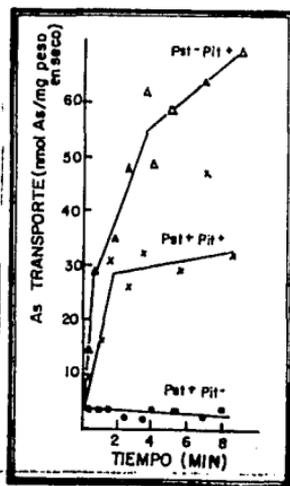


Fig.No. 54 Acumulación intracelular de arsenato vía sistemas de transporte de fosfato, Pst y Pit. GR5172, Pst⁺, • ; GR2131, + ; GR5178, Δ .

En la figura anterior se observa que los microorganismos que poseen el sistema de transporte Pit, acumulan una mayor concentración de arsenato que los que poseen el sistema de transporte Pst.

Durante los estudios Willsky y Malamy observan que:

- en presencia de un desacoplante de energía, como el 2,4-dinitrofenol, los sistemas de transporte del fosfato se inhiben.
- el sistema de transporte Pst es sensible al cianuro.
- ambos sistemas necesitan de una fuente de energía fácilmente metabolizable para poder transportar el fosfato (glucosa).
- los análisis cinéticos del transporte de fosfato muestran que los sistemas Pst y Pit no se encuentran completamente activos en una cepa que contenga ambos sistemas. Los sistemas Pst y Pit responden diferente en presencia de arsenato.
- Las cepas que contienen el sistema Pit no crecen en presencia de arsenato, ya que lo acumulan.
- una cepa Pst dependiente crece en un medio que contenga arsenato, aunque reduce su crecimiento normal. Estas células no acumulan el arsenato, debido a que se incrementa el transporte de fosfato.

El incremento en la capacidad de transporte del fosfato en el sistema Pst despues de la exposici3n al arsenato , se debe a que el arsenato es un ihibidor competitivo del transporte del fosfato ,vía sistema Pst, y causa una represión en este sistema (259).

Algunos informes señalan que los dos sistemas de transporte de fosfato, difieren genéticamente .Los genes phoS y phoT codifican el sistema de transporte Pst, ambos genes son de importancia en la regulaci3n de la síntesis de la fosfata-sa alcalina (enzima periplásmica cuya síntesis se induce por la falta de fosfato),El gene phoT es necesario para el funcionamiento del sistema de transporte Pst, y el gene phoS se requiere para mantener la especificidad del sistema .Estos genes producen la síntesis de 3 proteínas periplásmicas , las cuales tienen un papel importante en el control de la actividad del transporte del fosfato(260).

Las cepas de Escherichia coli que poseen el sistema de transporte Pit pierden el ATP intracelular , 60 min. despues de la adici3n de arsenato .En los microorganismos que tienen ambos sistemas Los niveles de ATP no se afectan con la adici3n de arsenato.Si las bacterias poseen el sistema Pst se observa una ligera pérdida del ATP interno ,despues de la adici3n del arsenato ;posteriormente cuando las células ya no estan expuestas a este compuesto se incrementan los niveles de ATP. Estos resultados indican que el arsenato puede penetrar a la célula por el sistema Pst y temporalmente interfiere con la

producción intracelular de ATP.

Actualmente se sabe que los plásmidos que confieren resistencia al arsenato no alteran los parámetros cinéticos de los sistemas Pst y Pit. Los informes indican que el transporte de arsenato es un proceso dependiente de energía y temperatura e independiente del pH y la concentración de fosfato(63,152). Mobley y Rosen confirman que la expulsión de arsenato y arsenito al exterior es codificado por plásmidos y también es dependiente de energía. Investigaciones realizadas en Staphylococcus aureus señalan que el sistema de transporte del fosfato tiene un alto grado de especificidad al del arsenato(10,152). El tratamiento de los microorganismos con shock osmótico, disminuye la capacidad de expulsión del arsenato. Este efecto se atribuye generalmente a la pérdida de una proteína periplásmica, aún no identificada(214).

5.2 MECANISMOS DE TRANSFORMACION DEL SELENIO Y TELURIO.

Los oxoaniones como el selenio , telurio y sus derivados , presentan cierta toxicidad para la mayoría de los microorganismos [28,214]. Estos compuestos tóxicos, propician la selección de cepas resistentes . Debido a la resistencia generada , los microorganismos pueden desarrollarse en elevadas concentraciones de los compuestos mencionados.

El estudio de la resistencia de los microorganismos a estos metales es de gran importancia , ya que entre ellos se encuentran bacterias patógenas al hombre [2] .

Los mecanismos de resistencia al selenio y telurio se estudian actualmente en E. U . A . . La resistencia al Telurio es codificada por plásmidos , ya identificados. En el caso del selenio aún no se aíslan los plásmidos correspondientes .

Entre los microorganismos más estudiados, en relación con el metabolismo del selenio y el telurio , se encuentran : Escherichia coli y Staphylococcus aureus, en ellos se demuestra que durante la transformación del metal se lleva acabo un gasto de energía (ATP).

La transformación de los metales y sus derivados se realizan a través de 3 mecanismos, los cuales dependen de la fisiología microbiana [28,214,225]. Tales mecanis-

mos son :

Reducción

Asimilación

Metilación.

5.2.1 Transformación del selenio y sus derivados.

A bajas concentraciones, el selenio es un micronutriente esencial para los microorganismos requerido para la formación de la enzima Formiato deshidrogenasa. En concentraciones elevadas es tóxico para los microorganismos e inhibe su crecimiento. El selenito y selenato tienen el mismo efecto.

5.2.1.1 Reducción y asimilación del selenio.

LaPage y Bascomb demuestran que una gran variedad de bacterias Gram negativas crecen en presencia de altos niveles de selenio (selenito de sodio 0.19 mM) (1,134). Entre estas bacterias se incluyen: Citrobacter sp., Hafnia sp., Proteus sp., Pseudomonas sp., y Salmonella sp.

Recientemente Burton y Giddins, realizan estudios para comprobar la resistencia del selenio y sus sales. Para estos estudios se toman muestras de agua, sedimento y algas de la Reserva de Kesterson (Kesterson National Wild Life Reserva of San Joaquin Valle of Calif.). Informes indican, que en la reserva antes mencionada, existe una alta contaminación con selenio y sus derivados, que se encuentra en el intervalo de 140 a 1,400 g/l, o sea, 100 veces mayor que el nivel normal de selenio (5×10^{-2} µg/l). La cantidad de contaminantes se determina por espectrofotometría de absorción atómica (2,28). Los estudios antes mencionados se realizan también en 9 áreas de 6 estados del oeste de E.U.A., en donde la concentración de selenio es elevada.

Las muestras de agua , algas y sedimentos se colectan en envases estériles y se procesan después de 48 horas. Se realizan diluciones seriadas en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.5) y se siembra en agar CPS (Agar caseína-peptona - almidón). Este medio es adecuado para recuperar bacterias heterotróficas provenientes del agua . Para el aislamiento de bacterias resistentes al selenito y selenato se utiliza el medio CPS suplementado con las sales antes mencionadas en una concentración de 10mM . Todas las bacterias resistentes al selenito y algunas selenato resistentes producen colonias rojas , indicando la reducción del selenito o selenato a selenio elemental .

Los resultados del estudio de la reserva de Kesterson se comparan con los obtenidos en la reserva de Volta . De estos estudios se concluye que más del 50% de las cepas aisladas provenientes de Kesterson son resistentes al selenito de sodio 10 mM en contraste con un menor porcentaje (4.5 %) de bacterias resistentes de la reserva de Volta. En la reserva de Kesterson , se observa que en el agua hay una alta concentración de selenato y en el sedimento una mayor concentración de selenito ($2,28$). La tabla No. 35 muestra los resultados obtenidos de este estudio.

Tabla No. 35 Porcentaje de bacterias aisladas de las reservas de Kesterson y Volta que muestran resistencia al selenito.			
muestras	microorg./ml de muestra	Cepas resist. a selenito 10mM (%)	Conc. de selenito por muestra (g/ml)
Kesterson			
sedimento	1×10^6	58.9	1,364
algas	1.72×10^7	50.3	<5
agua	2.35×10^8	53.8	150
Volta			
sedimento	1.8×10^8	1.2	<5
algas	4.6×10^5	4.5	ND
agua	4.03×10^7	2.2	<5

La Tabla anterior muestra que el porcentaje de cepas resistentes a Selenito de sodio (10 mM) es mayor en la reserva de Kesterson. La Tabla No. 36 muestra el porcentaje de cepas resistentes al selenito, capaces de reducir el selenito a selenio.

Tabla No. 36 Porcentaje de bacterias aisladas de las reservas de Kesterson y Volta, capaces de reducir el selenito.		
Sitio geográfico de recolección	muestras	microorg. capaces de reducir el selenito a selenio (%)
Kesterson	sedimento	90.0
	algas	98.7
	agua	66.8
Volta	sedimento	20.6
	algas	25.8
	agua	2.2

Los resultados mostrados en la tabla anterior sugieren la existencia de una alta concentración de bacterias reductoras de selenito en la reserva de Kesterson. Durante otro estudio LaPage y Bascomb determinan, que el número de bacterias reductoras de selenato es menor.

Microorganismos resistentes al selenio y derivados, se aíslan aún cuando los estudios se realizan a concentraciones mayores de selenito y selenato de sodio (20 y 30 mM) (134).

Entre las bacterias Gram positivos, selenito-resistentes, aisladas a estas concentraciones, se encuentran: Corynebacterium sp., Arthrobacter sp., y Bacillus sp. Entre las bacterias Gram negativas se presentan los siguientes géneros en orden decreciente de ocurrencia: Pseudomonas sp., Aeromonas sp., Flavobacterium sp., y Acinetobacter sp. Dentro de las bacterias nombradas anteriormente, Corynebacterium sp. es el género que presenta con mayor frecuencia resistencia al selenio.

Entre los microorganismos capaces de reducir selenato se encuentran: Citrobacter sp., Flavobacterium sp., Pseudomonas sp. y Desulfovibrio desulfuricans sub.sp. aestuarii. Estudios previos en muestras de suelo demuestran, que solo un pequeño porcentaje de las cepas aisladas reducen el selenato a selenio (28).

En la Tabla No. 37 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias de selenito, selenato, telurito y telurato para las bacterias aisladas de la reserva de Kesterson y Volta.

Tabla No. 37 Concentraciones mínimas inhibitorias de selenito, selenato, telurito y telurato de algunas bacterias selenito-resistentes y selenito-sensibles aisladas de las reservas de Kesterson y Volta.

Cepas aisladas	MIC (mM) de :				
	Se ⁴⁺	Se ²⁺	Te ⁴⁺	Te ⁶⁺	
Resistentes					
<u>Acinetobacter</u> sp.	VS3	50	200	0.5	4
<u>Aeromonas hidrophila</u>	VS6	50	100	0.03	2
<u>Aeromonas hidrophila</u>	VS8	50	12.5	0.03	1
<u>Aerobacter</u> sp.	VW8	50	200	0.125	1
<u>Bacillus</u> sp.	KW3	200	200	1.0	4
<u>Citrobacter freundii</u>	KS8	200	100	0.5	4
<u>Corynebacterium</u> sp.	KS6	25	6.25	0.015	0.125
<u>Corynebacterium</u> sp.	VS1	25	6.25	0.06	1
<u>Corynebacterium</u> sp.	VS5	200	200	0.5	4
<u>Flavobacterium</u> sp.	KS4	50	200	0.06	0.25
<u>Flavobacterium</u> sp.	VW5	50	50	0.015	0.25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	VS7	25	100	0.03	1
<u>Pseudomonas cepacia</u>	KS5	100	200	0.015	0.03
<u>Pseudomonas</u> sp.	VW7	200	100	1.0	4
Sensibles					
<u>Aeromonas</u> sp.	KA3	0.78	25	0.03	0.5
<u>Corynebacterium</u> sp.	VS13	0.78	1.56	0.015	0.25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	VS10	1.56	1.56	0.125	4.0

Abreviaciones :

- KS sedimentos del lago Kesterson
- KW agua del lago Kesterson
- KA algas del lago Kesterson
- VS sedimentos del lago Volta
- VW agua del lago Volta
- VA algas del lago Volta

Los datos de la tabla anterior indican que la concentración de selenito y selenato varía en un intervalo de 25 a más de 200 mM. Entre los microorganismos aislados se encuentran 3 géneros sensibles al selenato y selenito : Aeromonas sp., Corynebacterium sp., y Pseudomonas aeruginosa .

La resistencia al selenio y sus sales no se encuentra asociada con la resistencia a otros metales (arsenito, arsenato, telurito y telurato) pero sí a algunos antibióticos (7, 24, 134, 214).

Estudios realizados indican que el metabolismo del selenito se lleva a cabo a través de 2 diferentes mecanismos :

- a) Reducción del selenito con obtención de selenio elemental a través de grupos sulfhidrilos .
- b) Incorporación del selenio a compuestos que contienen grupos sulfuros.

El selenito se reduce a selenio , el cual se incorpora posteriormente a los aminoácidos y proteínas en lugar del azufre de los grupos sulfhidrilos (1, 2).

Ahluwalia y Saxena realizan estudios que indican que la reducción del selenito (Na_2SeO_3) a selenio se lleva a cabo enzimáticamente ; las evidencias indican , que el crecimiento bacteriano es esencial para que se efectúe la reducción. Los investigadores antes mencionados utilizan para su estudio

Escherichia coli K₁₂C₄P* en fase exponencial de crecimiento. El estudio se basa en la observación de la transformación del selenito a selenio metálico, el cual es de color rojo, que se intensifica con el aumento de su concentración. El selenio metálico que se deposita intracelularmente es soluble en disulfuro de carbono (CS₂) y se usa para remover y disolver el selenio formado. Es importante mencionar que el selenio ligado a las proteínas no se disuelve en CS₂, y para su determinación se necesita realizar una hidrólisis enzimática de proteínas. Las células se rompen por sonicación y se lavan 3 veces con disulfuro de carbono, suficiente para extraer la mínima cantidad de selenio libre. Los resultados de estos estudios se presentan en la tabla No. 38.

Tabla No. 38 Relación entre el crecimiento de Escherichia coli y el metabolismo del selenio.

Muestra	tiempo de crecimiento (hrs)	Absorbancia a 650 nm	Nitrógeno total	Selenio	
				antes del lavado	después del lavado
			µg/25 ml de cultivo		
1	4	0.632	475	47	44
2	6	0.726	560	60	56
3	8	0.796	625	71	66
4	10	0.836	625	88	80
5	12	0.897	650	110	95
6	14	0.939	650	145	130
7	16	0.994	650	175	160
8	18	1.022	685	180	160
9	24	1.038	667	220	200
10	26	1.099	618	420	230
11	31	0.910	560	440	230
12	35	0.840	523	430	220
13 (control)	24	-	1550	-	-

En la tabla anterior se observa la diferencia que existe entre el selenio antes y después de lavar, que indica la cantidad de selenio libre .

Cuando el selenito se encuentra en niveles tóxicos , no solo inhibe el crecimiento , sino también causa muerte y lisis de los microorganismos . Después de 11 horas de incubación , el crecimiento bacteriano disminuye y la reducción del selenito continúa.

Parte del selenio que se obtiene de la reducción del selenito se acumula intracelularmente , en el espacio periplásmico . La Figura No.35 presenta una fotografía de Escherichia coli realizada por microscopía electrónica , en la cual se observan gránulos o depósitos de selenio, los cuales no están distribuidos uniformemente.

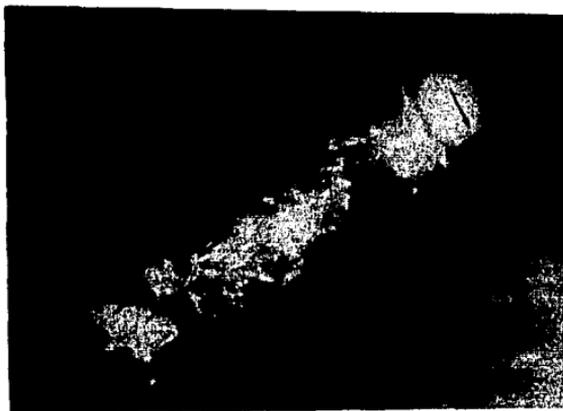


Fig.No. 35

Gránulos de selenio en Escherichia coli .
X 40,000

Parte del selenio se incorpora a los aminoácidos con la ayuda de la enzima Formiato deshidrogenasa .La incorporación se realiza de la siguiente manera:

40% en el citoplasma

28% en pared celular

18% en fracción ribosomal

El selenio depositado intracelularmente se incorpora a los aminoácidos (metionina y cisteína), sustituyendo al sulfuro (grupos tioles de las proteínas) , formando selenio-cisteína, selenio-metionina , selenio Acetil CoA y selenio taurina (211).

La incorporación del selenio ,se debe a la competencia que existe con los grupos sulfhidrilos .Esta competencia se realiza cuando disminuye la cantidad de sulfuros intracelulares presentes en el medio de cultivo.En la Fig.No. 56 se presenta la curva de crecimiento de Escherichia coli en un medio deficiente de azufre.

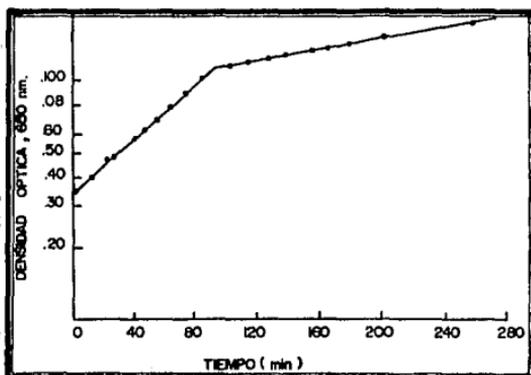


Fig.No. 56 Crecimiento de Escherichia coli en un medio deficiente de azufre

La gráfica anterior demuestra que el microorganismo se desarrolla durante 85 min., al término de los cuales el crecimiento disminuye, debido a la carencia de fuente de azufre.

Para demostrar la incorporación de selenio Tryque Tuve y Harold H. Williams utilizan en sus experimentos concentraciones subóptimas de selenio radiactivo. Los investigadores cultivan Escherichia coli en un medio deficiente de azufre que contiene selenio radiactivo (10 g/ml) y miden posteriormente su incorporación en relación con el crecimiento del microorganismo (g en peso seco). La incorporación del selenio aumenta proporcionalmente a la disminución del azufre (Fig. No. 57).

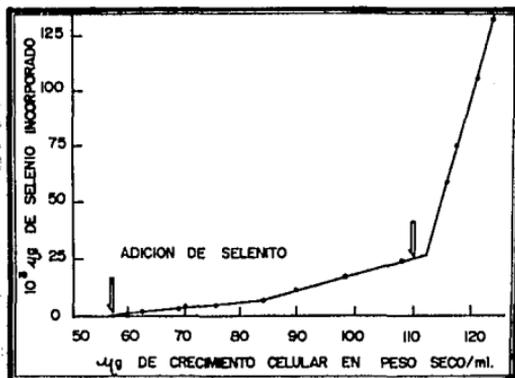


Fig. No. 57

Incorporación de selenio radiactivo en Escherichia coli. La segunda flecha indica el punto donde se agota el azufre.

Los mismos resultados se pueden observar en la Fig.No.58 , con la diferencia que en este caso se relaciona la incorporación del selenio radioactivo con el tiempo transcurrido .La segunda flecha indica el tiempo en el cual se agota el azufre e incrementa rápidamente la incorporación del selenio(246).

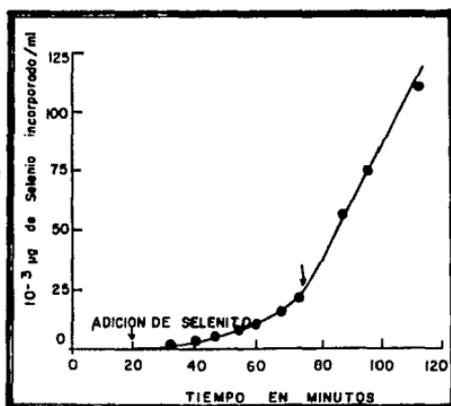


Fig.No.58 Incorporación de selenito radioactivo por *Escherichia coli*. La segunda flecha indica el punto donde se agota el azufre.

Existen al menos 2 explicaciones de los resultados obtenidos en el experimento anterior:

- El depósito de selenio elemental intracelular y la reacción del selenito con los grupos sulfhidrilos son apreciables y simultáneos con la disminución del azufre en el medio de cultivo.
- Puede esperarse que : La competencia entre el sulfuro y el selenio ocurre no solamente a nivel de oxidación de sulfito-selenito, sino también a cualquier nivel metabólico al cual actúe la enzima que sintetiza o incorpora tanto al azufre como análogos del selenio. Como consecuencia después de agotar la fuente de azufre para síntesis de metionina y cisteína , el microorganismo incorpora el selenio.

Experimentos realizados en presencia de 2,4-Dinitrofenol y Cloramfenicol muestran que la incorporación del selenio , puede ser dependiente de la síntesis de proteínas , fosforilación oxidativa y el crecimiento celular . Cuando se añade Cloramfenicol al cultivo, la incorporación del selenio no se detecta. Un experimento similar con 2,4-Dinitrofenol (10^{-4} M), tampoco demuestra incorporación de selenio. Cuando se añade una concentración de 2,4-Dinitrofenol suficiente para disminuir al 50 % el crecimiento del microorganismo , la incorporación del selenio decrece proporcionalmente [28, 246].

5.2.1.2. Metilación del selenio y sus derivados.

Algunos microorganismos selenito resistentes en el sedimento y agua de ríos, tienen la capacidad de incorporar selenio a compuestos orgánicos y formar: Dimetil selenio, Dimetil diselenio y trimetil selenio. Estos compuestos son tóxicos para organismos superiores y se reaccionan con el típico olor a ajo (32).

Esta transformación es de gran importancia ecológica, ya que permite la conversión de selenio inorgánico a compuestos orgánicos, los cuales son volátiles y pasan al medio ambiente, disminuyendo así la contaminación por este metal y sus sales (229).

Existen microorganismos capaces de metilar otros metales como: Mercurio, Arsénico, Estaño y Plomo. En este caso se forman compuestos más tóxicos que los anteriores para organismos superiores (214).

Burton y Giddins aíslan microorganismos del agua y suelo contaminados con selenio e identifican a los siguientes géneros bacterianos capaces de metilarlo: Aeromonas sp., Flavobacterium sp., Corynebacterium sp., y Pseudomonas sp. Posteriormente Chau y Wong encuentran que una gran cantidad de bacterias selenito reductoras, aisladas del suelo y sedimento de ríos no contaminados con el compuesto mencionado, son capaces de producir Dimetil selenio, Dimetil diselenio y Trimetil selenio. La metilación ocurre cuando los microorganismos se encuentran en fase "Log" de crecimiento (2, 28).

La temperatura es un factor que influye en la producción de compuestos orgánicos del selenio. La incubación a una temperatura de 10 a 20°C, favorece la producción de dimetil selenio y a 4°C la disminuye. Otro factor importante en la producción de dimetil selenio es la concentración de sulfato en el medio. Esta conversión se realiza tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Fleming y Alexander trabajan con Penicillium sp. y determinan el efecto de diferentes concentraciones de sulfato sobre la producción de dimetil selenio, por el hongo mencionado. Los investigadores utilizan dos medios de cultivo con distintas concentraciones de selenito de sodio 1,000 g/ml. Los resultados demuestran que al aumentar la concentración de sulfato de magnesio se eleva la producción de dimetil selenio cuando la concentración es de 1,000 mg/ml, en cambio a una conc. de 100 g/ml la producción de dimetil selenio aumenta al principio y posteriormente disminuye conforme se agota el selenio (Fig. No.

59) (67).

Los mismos investigadores realizan estudios para determinar el efecto de los aminoácidos metionina y homocisteína, sobre la producción de dimetilselenio. Los resultados del estudio demuestran que la metionina estimula el crecimiento del hongo y la producción de dimetil selenio. Este estímulo es todavía mayor en presencia de sulfato. En la Tabla No. 39 se muestran los resultados obtenidos.

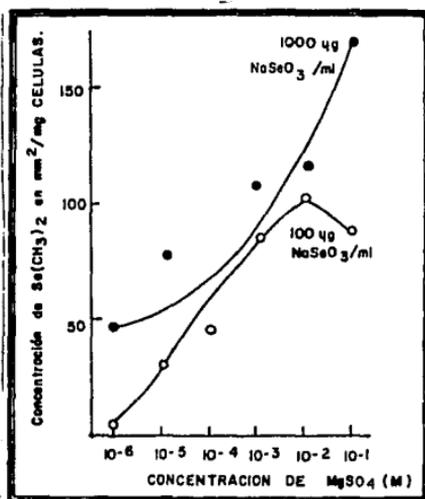


Fig.No. 59 Efecto de la concentración del sulfato sobre la producción de dimetil selenio

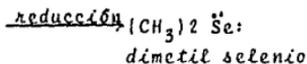
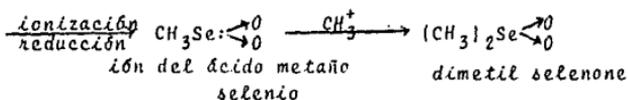
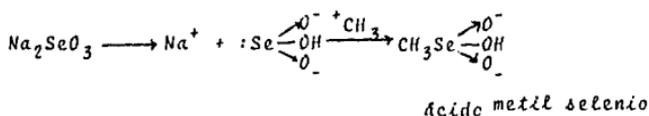
Tabla No.39 Efecto de la metionina en el crecimiento y producción de dimetil selenio en presencia de diferentes concentraciones de selenito y sulfato.

Concentración de sulfato (M)	concentración de selenito ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Dimetil selenio formado (mm^2/mg peso seco)				
		concentración de metionina ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
		0	20	40	100	200
10^{-5}	1,000	24.6	123	-	81.4	116
10^{-3}	1,000	80.3	-	118	122	129

En la Tabla No 39 se observa que al aumentar la concentración de sulfatos y metionina se estimula la producción de dimetil selenio.

Los estudios por microscopía electrónica indican que las bacterias capaces de producir dimetil selenio, acumulan gránulos intracelulares. Por medio de un análisis de dispersión de rayos X, se determina que los gránulos intracelulares contienen selenio metálico [105, 106].

Evidentemente las bacterias tienen la habilidad de retener selenio y transformarlo a compuestos volátiles metilados. Frederick Challengier postula un mecanismo de metilación para la obtención de dimetil selenio, el cual proviene de la descomposición de metil selenato de sodio como se indica a continuación:



La metilación es un mecanismo de desintoxicación cuando el microorganismo crece en presencia de altas concentraciones de selenio [113].

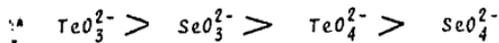
Raymond J. Shamberger encuentra Dimetil y trimetil selenio en pulmones y orina de ratas. El investigador señala, que la formación de estos compuestos metilados constituye también un mecanismo de desintoxicación en la rata.

5.2 .2. Transformación del Telurio y sus derivados.

El telurio, telurito y telurato son compuestos altamente tóxicos para bacterias Gram positivas y negativas (134). En la mayoría de los microorganismos la resistencia a los compuestos mencionados es codificada por plásmidos. Algunos autores denominan esta resistencia "Resistencia adquirida", mientras que en microorganismos como: Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, C.xerosis y Staphylococcus aureus, los genes que codifican dicha resistencia se encuentran en el genoma bacteriano "Resistencia natural" (28).

La toxicidad del telurito y telurato se atribuye a su propiedad como un oxidante fuerte y ser fácilmente reducido por Oxido reductasas bajo condiciones fisiológicas. El selenio, telurio y sus derivados son químicamente semejantes.

La actividad tóxica de los derivados del telurio y el selenio, se presenta a continuación:



Algunos investigadores indican que al crecer los microorganismos aumenta su susceptibilidad hacia estos compuestos y como conse-

cuencia disminuye el metabolismo del azufre(101,206,234).

5.2.2.1 Reducción y asimilación del Telurito y sus derivados.

Recientemente Summers y Jacoby realizan estudios para identificar bacterias resistentes al telurito. Para el aislamiento utilizan agar Infusión de corazón con telurito de potasio al 0.5 %. Los investigadores logran aislar e identificar los siguientes microorganismos:

<u>Serratia marcescens</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>
<u>Citrobacter freundii</u>	<u>Spirillum serpens</u>
<u>Pseudomonas sp.</u>	<u>Bacillus subtilis</u>
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>Streptococcus faecalis</u>
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
<u>Escherichia coli</u>	<u>Lactobacillus sp.</u>
<u>Salmonella thyphimurium</u>	<u>Rhodospirillum rubrum</u>
<u>Proteus vulgaris</u>	<u>Azotobacter vinelandii</u>
<u>Bacillus anthracis.</u>	

Los resultados de los estudios indican que las bacterias Gram negativas son generalmente más susceptibles al telurito que las Gram positivas(154,225).

Cuando las bacterias telurito resistentes se cultivan en medios que contienen telurito de potasio, producen un precipitado negro, debido a su reducción. Norton y Anderson observan la presencia de cristales negros en cultivos de Corynebacterium diphtheriae, Bacillus anthracis y Streptococcus faecalis, estos cristales se encuentran extra e intracelularmente. Los estudios con rayos X indican la presencia de telurito metálico (154).

La reducción del telurito a telurio metálico se lleva a cabo intracelularmente. Parte del telurio formado se deposita en el espacio periplásmico, parte extracelularmente y en nucleoplasma. A continuación se muestran fotografías de B. subtilis y P. vulgaris en los cuales se observan los depósitos extracelulares e intracelulares (espacio periplásmico y nucleoplasma) (105, 106).

En las Fig.No .60 y No.61 se observan los depósitos extracelulares e intracelulares de telurio (color blanco) en P. vulgaris (40,000X) y B. subtilis (37,000X), mientras que la Fig.No.62 muestra los depósitos de telurio que se encuentran en espacio periplásmico de B. subtilis (158,000X).

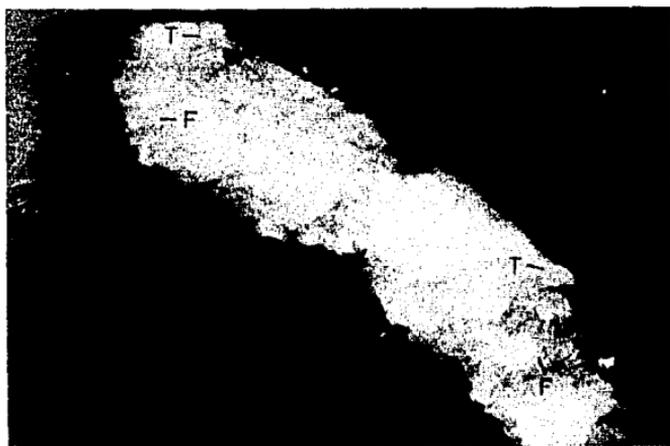


Fig.No. 60 Depósitos extracelulares e intracelulares de telurio en Proteus vulgaris.



Fig.No.61 Depósitos intracelulares de telurio en *Proteus vulgaris*.



Fig.No.62 Depósitos de telurio en el espacio periplásmico de *Bacillus subtilis*

Teraí y Kamahora trabajan con *Mycobacterium avium* y encuentran que la enzima Telurito reductasa, así como la Malato deshidrogenasa son indispensables para la reducción del telurito. En la Tabla No 40 se muestran los efectos de los agentes físicos y químicos sobre la enzima Telurito reductasa.

Tabla No. 40 Efecto de los agentes físicos y químicos sobre la enzima Telurito reductasa de *Mycobacterium avium*.

<u>Agentes Físicos y Químicos</u>	Conc. (M)	Actividad enzimática
Efecto de la temperatura	50°C 65°C 70°C	- buena estable
Efecto de iones metálicos	Ba ²⁺ , Mn ²⁺ , Pb ²⁺ Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Ag ⁺ Zn ⁺ Fe ²⁺	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴ 10 ⁻³ ningun efecto inhibe 50% estimula estimula
Efecto del pH	6.5 7.0 8.0	- - óptima disminuye disminuye
Efecto de algunas sustancias químicas	8, hidroxiquinoleína* Cianuro* EDTA 'dipiridil	10 ⁻³ " 10 ⁻³ " estimula estimula estimula inhibe

*Estimulan en un 100 % la actividad enzimática,

Para la extracción de la enzima telurito reductasa se utiliza el siguiente procedimiento: aproximadamente 200 g de células se mezclan con 200 g de arena de mar en un mortero mecánico frío durante 40 minutos, se añaden 400 ml de agua destilada y se centrifuga a 3,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se centrifuga a una velocidad de 12,000xg durante 60 min y se vuelve a centrifugar a 38,000 rpm durante 40 min. El precipitado obtenido se lava con agua destilada y se vuelve a centrifugar durante 30 min. El sobrenadante contiene la enzima telurito reductasa. La actividad enzimática se cuantifica espectrofotométricamente. La reacción consiste en mezclar 0.5 ml de la preparación enzimática, 0.3 ml de solución amortiguadora Tris (Hidroximetil amino metano) pH 6.5, 0.1 ml de telurito de potasio (200 M), Deshidrogenasa mállica, Sulfato cromo (100 M). La mezcla se incuba durante 30 min. a una temperatura de 37°C en condiciones aerobias, después de la incubación se agregan 2 ml de cloruro mercúrico (10^{-3} M) para detener la reacción. La mezcla de reacción adquiere una coloración negra que es proporcional a la actividad enzimática. La lectura se efectúa a una longitud de onda de 500 nm. En la Tabla No 41 se muestra el efecto de algunos compuestos químicos sobre la actividad de la enzima Telurito Reductasa obtenida en los estudios anteriores.

Tabla No.41 Efecto de algunos compuestos químicos sobre la enzima Telurito Reductasa.		
Compuestos	Concentración (M)	Actividad enzimática (E X 10 ³ /min)
-	-	439
CoCl ₂	10 ⁻³	223
BaSO ₄	10 ⁻³	340
MnCl ₂	10 ⁻³	354
Pb(CH ₃ COO) ₂	10 ⁻³	293
Fe ₂ (SO ₄) ₂	10 ⁻³	630
FeSO ₄	10 ⁻³	1110
AgNO ₃	10 ⁻⁴	5
AgNO ₃	10 ⁻⁵	215
CdSO ₄	10 ⁻⁴	20
CdSO ₄	10 ⁻⁵	165
CuSO ₄	10 ⁻⁴	2
CuSO ₄	10 ⁻⁵	175
HgCl ₂	10 ⁻⁴	4
HgCl ₂	10 ⁻⁵	42
ZnCl ₂	10 ⁻⁴	165
8-Hidroxiquinoleína	10 ⁻³	630
EDTA	10 ⁻³	285
EDTA	10 ⁻²	698
KCN	10 ⁻³	530
KCN	10 ⁻²	1300

En la tabla anterior se observa que la actividad de la enzima Telurito reductasa se inhibe en presencia de AgNO₃ (10⁻⁴ M), CuSO₄ (10⁻⁴ M) y HgCl₂ (10⁻⁴ M) y se estimula con FeSO₄ (10⁻³ M) y KCN (10 M⁻²).

Trabajos recientes reportan que la enzima Telurito reductasa presente en Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium avium, es capaz de reducir el telurito solamente en presencia de : Malato, Deshidrogenasa málica, NADH (nicotín adenín dinucleótido) y del ión férrico o ferroso. El malato, la enzima deshidrogenasa málica y NADH

se utilizan por la enzima como donadores de electrones y el ion férrico o férrico como cofactor (234).

En las bacterias que adquieren la resistencia por medio de plásmidos , la reducción del telurito se realiza de modo similar a la reducción del selenito . La reducción del telurito a telurio metálico se lleva acabo a través de grupos sulfhidrilos , con incorporación posterior del Telurio a la metionina y posiblemente cisteína.

Scala y Williams realizan un estudio con 2 cepas de Escherichia coli : ML30 y ATCC 9663. La cepa ATCC 9663 es auxotrofa para la metionina . Ambos microorganismos se desarrollan en un medio con diferentes concentraciones de Telurito de potasio y se incuban durante 24 horas . En la tabla No.42 se presentan los resultados de este estudio.

Tabla No. 42 Crecimiento de Escherichia coli ML30 y ATCC 9663 en un medio con Telurito y L-metionina.

Cepa	concentración de metionina (M)	concentración de TeO^{-} (M X 10^{-6})								
		0	3	12	36	48	60	72	88	
		crecimiento (μ g/ml)								
ML-30	0	590	580	480	386	376	340	322	292	
ML-30	5×10^{-4}	600	294	197	176	150	136	64	29	
ATCC 9663	5×10^{-4}	604	287	200	197	172	128	70	26	

Los valores presentados en la Tabla No. muestran que cuando aumenta la concentración del telurito , el

crecimiento bacteriano disminuye proporcionalmente . La toxicidad del telurito aumenta cuando ambas cepas crecen en presencia de metionina ; la disminución del crecimiento es mayor en Escherichia coli ATCC 9663 . Los mismos investigadores realizan estudios con diferentes concentraciones de l-metionina y D-metionina en presencia de una concentración constante de telurito (Tabla No. 43) .

Tabla No.43 Crecimiento de <u>Escherichia coli</u> ML-30 en un medio que contiene concentraciones variables de D- y L-metionina y constante de telurito.									
Isómero de metionina	control sin telurito	concentración de telurito 24×10^{-6} M							
		Concentración de metionina ($M \times 10^{-6}$)							
		40	0.0	4	8	12	16	24	48
		µg/ ml de medio							
D-metionina	500	392	387	387	391	400	395	393	
L-metionina	550	395	237	208	200	186	166	157	

Los datos de la Tabla No.43 indica que la toxicidad del telurito de potasio aumenta cuando la cepa crece en presencia de L-metionina, mientras que con D-metionina no se presenta el mismo efecto. Se observa que el crecimiento bacteriano aumenta hasta una conc. de 16×10^{-6} de D-metionina y posteriormente disminuye . Scala y Williams observan que a bajas conc. de telurito el crecimiento de Escherichia coli ML-30 y ATCC 9663 no se afecta . El crecimiento de ambas cepas disminuye , si al medio con telurito se le añade L-metionina (Fig No. 63 y No.64)

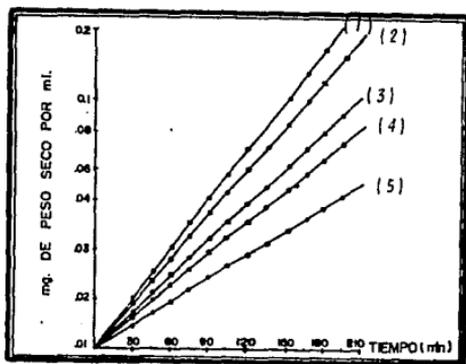


Fig.No. 63 Crecimiento de *Escherichia coli* en un medio con sulfatos ($6.0 \times 10^{-6} M$), además de: (1) L-metionina ($5 \times 10^{-4} M$), sulfato $2.4 \times 10^{-4} M$; (2) sulfato ($4.8 \times 10^{-4} M$) y telurito ($8 \times 10^{-6} M$); (3) sulfato ($4.8 \times 10^{-4} M$) y telurito ($20 \times 10^{-6} M$); (4) L-metionina ($5 \times 10^{-4} M$), sulfato ($2.4 \times 10^{-4} M$) y telurito ($8 \times 10^{-6} M$); (5) L-metionina ($5 \times 10^{-4} M$), sulfatos ($2.4 \times 10^{-4} M$) y telurito ($32 \times 10^{-6} M$)

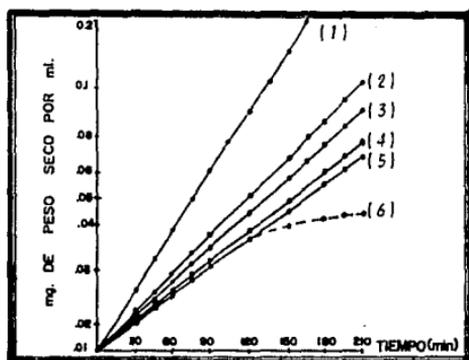


Fig.No. 64 Crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 9663 en un medio que contiene L-metionina ($5 \times 10^{-4} M$) y fosfato ($3.0 \times 10^{-6} M$) además de: (1) control, (2) telurito ($8 \times 10^{-6} M$), (3) $32 \times 10^{-6} M$, (4) $40 \times 10^{-6} M$, (5) $80 \times 10^{-6} M$.

En las figuras anteriores se muestran las curvas de crecimiento de Escherichia coli ML-30 y ATCC 9663 (mg de peso seco/ml contra tiempo). En ambas curvas se observa que la toxicidad del telurito aumenta al añadir al medio de cultivo L-metionina aún en presencia de sulfatos, lo que se refleja con la disminución del crecimiento bacteriano. Si la conc. de L-metionina es constante y solo aumenta la conc. de telurito, su toxicidad se eleva.

Los investigadores antes mencionados realizan estudios del efecto del selenito y telurito sobre el crecimiento de Escherichia coli ML-30 y ATCC 9663 cuando al medio se le incorporan diferentes compuestos que contienen azufre y que pueden incorporar a estos metales (Tabla No. 44).

Tabla No. 44 Efecto de diferentes conc. de Selenito y Telurito sobre el crecimiento de Escherichia coli ML-30, cuando al medio se le incorporan distintas fuentes de azufre.

Compuesto que se analiza	SeO_3^{--} (cong.) $\text{M}^3 \times 10^{-5}$	0.0	8	24	40	56
	TeO_3^{--} (cong.) $\text{M}^3 \times 10^{-6}$	0.0	8	24	40	56
	Crecimiento en $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio					
L-Cisteína	SeO^{-2}	560	565	565	567	552
	TeO^{-2}	560	0	0	0	0
Taurina	SeO^{-2}	605	595	590	595	597
	TeO^{-2}	605	408	397	350	345
L-Homocisteína	SeO^{-2}	565	500	210	100	25
	TeO^{-2}	565	0	0	0	0

En la tabla No. 44 se observa que la adición de L-Cisteína en un medio con selenito incrementa inicialmente el crecimiento del microorganismo hasta una conc. de 56×10^{-5} , a partir de la cual disminuye proporcionalmente. La adición del compuesto anterior a un medio con telurito inhibe el crecimiento bacteriano totalmente. Al agregar Taurina a un medio con selenito el crecimiento no se afecta, pero en un medio con telurito el crecimiento disminuye proporcionalmente al elevar la conc. de telurito. Si se añade L-Homocisteína a un medio con selenito, el crecimiento disminuye proporcionalmente al aumento de la conc. de selenito, pero en presencia de telurito no hay crecimiento bacteriano.

La comparación de la toxicidad del telurito y selenito también se realiza con compuestos que contienen azufre e incorporan selenio pero no participan en el metabolismo del azufre. La tabla No. 45 resume los resultados obtenidos.

Tabla No. 45 Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ML-30 en medios que contienen fuente de azufre que no participa en el metabolismo del azufre.					
Aniones	Compuestos que contienen azufre (M)				
	Ninguno	Tionina	Ac. Oleico	Tiourea	2,4 tiodolidina
	Crecimiento ($\mu\text{g/ml}$ de medio)				
Controles	590	595	570	555	460
SeO_3^{2-} (24 a 80×10^{-6})	594	595	560	555	460
TeO_3^{2-} (24×10^{-6} M)	385	0.0	0.0	0.0	0.0

Los resultados que se obtienen en la Tabla anterior indican que , la adición de selenito al medio de cultivo que contiene respectivamente tiónina , *ác. oleico*, tiorrea y 2,4 tiazolidindiona , no afecta el crecimiento del microorganismo . El crecimiento de Escherichia coli ML-30 se inhibe totalmente cuando se agregan los compuestos antes mencionados a un medio de cultivo con telurito de potasio . Con los estudios anteriores se concluye , que el mecanismo de toxicidad del telurito es diferente al del selenito { 206 }.

4.3.2.2 Metilación del Telurio

El mecanismo de desintoxicación del telurio , incluye la producción de compuestos metilados . Recientemente R.W. Fleming y M. Alexander realizan estudios sobre la metilación del telurio , selenio y sus derivados con Penicillium sp. . La cepa microbiana con la que trabajan es productora tanto de dimetil selenio como de dimetil telurio; Los investigadores observan el efecto del telurio (50 - 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), telurato (5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tetracloruro de telurio (20 - 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sobre la producción de dimetil selenio y dimetil telurio. La presencia de estos compuestos disminuye en un 50 % la cantidad de dimetil selenio producido . Al incrementar los niveles de telurio en el medio de cultivo se genera un segundo producto que se identifica como dimetil telurio por cromatografía de gases { 67 }.

La metilación del telurio se lleva a cabo siempre y cuando en el medio se encuentren presentes los dos metales (selenio y telurio) , en ausencia de selenio la metilación del telurio no se efectúa. Lo anterior indica que la bio-

síntesis de compuestos metilados del telurio , se induce en presencia de selenio (113)

La producción de dimetil selenio y dimetil telurio depende de las concentraciones de selenio y telurio en el medio de cultivo. El dimetil selenio se detecta cuando aumenta la conc. de selenio , pero si aumenta la conc. de telurio el producto que se obtiene es dimetil telurio . En la Fig. No.65 se observa una gráfica que presenta la producción de dimetil telurio y dimetil selenio en presencia de diferentes conc. de tetracloruro de telurio , y una conc. constante de selenito (100 $\mu\text{g/ml}$).

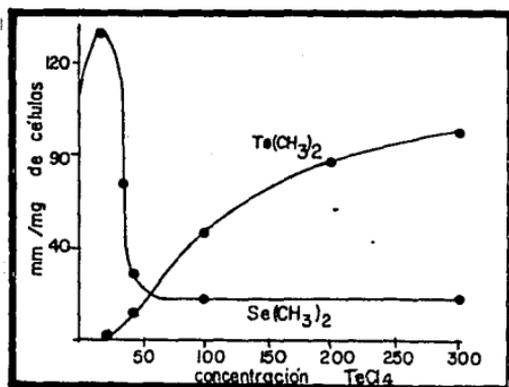


Fig. No. 65 Producción de Dimetilselenio y dimetiltelurio en presencia de selenito (100 μg) y varias concentraciones de TeCl_4 .

En la Fig. No. 65 se observa que cuando aumenta la conc. del tetracloruro de telurio (TeCl_4), aumenta la producción de dimetil telurio y disminuye rápidamente la de dimetil selenio hasta $30 \text{ mm}^2 / \text{mg}$ de células. En estas condiciones la conc. de dimetil selenio permanece constante.

5.2.2.3 Plásmidos que confieren resistencia al telurio y sus derivados.

Recientemente Summers y Jacoby demuestran que la resistencia de los microorganismos a las sales del Telurio, es conferida por plásmidos R (225). Los mismos investigadores aíslan plásmidos grandes y pequeños de Ps. aeruginosa y Escherichia coli. Ambas bacterias se desarrollan en un medio de Agar Infusión de Corazón con telurito de potasio al 0.5% o una solución saturada de telurito de potasio, la incubación se realiza a 24°C durante 24 horas. Algunas colonias se inoculan en 3 ml de caldo L e incuban a una temperatura de 30°C durante toda la noche, posteriormente el cultivo se centrifuga a 5,700 rpm a 4°C durante 7 min. El paquete celular se suspende en 1 ml de solución amortiguadora E, las células se lisan adicionando 2 ml de lisozima en solución salina isotónica, con agitación fuerte, posteriormente se agregan 2 volúmenes de dodecíl sulfato de sodio al 3% [en sol. amortiguadora Tris, pH 12.6]. La solución obtenida se calienta a $50 - 60^\circ \text{C}$ durante 20 min. en baño a temperatura constante y se adicionan 2 volúmenes de solución Fenol-Cloroformo (1:1). La solución se agita fuertemente y se centrifuga durante 13 min. a 40°C (6,000 rpm). La

fase acuosa superior se transfiere a un tubo con tapón de rosca . Inmediatamente se toman 2 pequeñas alícuotas y se mezclan con 10 ml de una solución compuesta de púrpura de bromocresol al 0.25% en glicerol 50%-acetato Tris 0.05M (pH 7.9) y se realiza una electroforesis en gel de agarosa (0.7 - 1 %). La lisis celular depende de la fase de crecimiento, temperatura y tiempo de incubación de las células .

Para el aislamiento de los plásmidos se toma en cuenta las características moleculares y covalentes del DNA circular . El DNA de los plásmidos se libera de las células por la acción de lisozima y dodecil sulfato de sodio alcalino y bajo condiciones de desnaturación del DNA cromosomal a temperaturas elevadas . Las proteínas y el residuo celular se remueve por extracción con una mezcla de Fenol-Cloroformo . Bajo estas condiciones la conc. del DNA cromosomal se reduce o elimina. El extracto clarificado se usa directamente para análisis electroforético .

Este procedimiento promueve el aislamiento selectivo del DNA extracromosomal , que puede utilizarse directamente para síntesis de proteínas , análisis con endonucleasas de restricción , transformación y experimentos de clonación (128).

En la Tabla No. 46 se muestran los plásmidos aislados de Pseudomonas aeruginosa , así como la concentración mínima inhibitoria (MIC) de telurito de potasio a la cual son susceptibles las bacterias que portan cada uno de los plásmidos aislados e identificados .

Tabla No. 46 Plásmidos que codifican resistencia al Telurito de Potasio aislados de Pseudomonas aeruginosa.

Plásmido	Grupo de inc.	Fenotipo	MIC de K_2TeO_4 (M).
RP1	P-1	CbKmTc	10^{-4}
RPJ	P-1	CbKmTc	10^{-4}
R30	P-1	CbKmTc	10^{-4}
R68	P-1	CbKmTc	10^{-4}
RP-638	P-1	CbKmTc	2×10^{-4}
R702	P-1	KmSmSuTcHgr	2×10^{-4}
R751	P-1	Tp	10^{-4}
R839	P-1	CbKmSmSuTcHgr	10^{-4}
R938	P-1	CbCmKmSmSuTcHgr	10^{-4}
R1033	P-1	CbCmGmKmSmSuTcHgr	2×10^{-3}
pMG1	P-2	GmSmSuHgrUv	10^{-3}
pMG2	P-2	GmSmSuHgrUv	10^{-3}
pMG5	P-2	AkBzKmsuTmHgrPmr	10^{-3}
RPL11	P-2	CbCmGmSmSuTcHgrPmr	10^{-3}
R38	P-2	SmSuTcHgrPmr	10^{-3}
R39	P-2	SmSuTcHgrPmr	10^{-3}
RmΔ-159	P-2	CmSmTcHgrPmr	10^{-3}
R931	P-2	SmTcHgrUv	10^{-3}
R3108	P-2	SmSuTcHgrPmr	10^{-3}
CAM	P-2	CamUv	10^{-3}
CAM-OCT	P-2	CamOctUv	10^{-3}
Rip-55	P-3	CbCmKmGmSuTmHgr	5×10^{-5}
Rip-64	P-3	CbCmGmSuTmHgr	5×10^{-4}
R679	P-4	SmSu	10^{-4}
R1162	P-4	SmSu	10^{-4}
R5265	P-4	SmSu	10^{-4}
RmΔ-163	P-5	CmSuTc	10^{-4}
RmΔ-149	P-6	CbGmSmSu	10^{-4}
RmΔ-148	P-7	Sm	10^{-4}
FP2	P-8	HgrPmr	10^{-4}
R46	N	CbSmSyTcAsr	10^{-4}
R7K	W	CbSm	10^{-4}
R388	W	SuTb	5×10^{-5}
Sa	W	CmGmKmSmSuTc	5×10^{-5}
RP1-1	?	Cb	5×10^{-4}
R2	?	CbSmSuUv	10^{-4}
RP8	?	Cb	5×10^{-4}
R91	?	Cb	10^{-4}
FP5	?	Hgr	2×10^{-4}

En la tabla anterior se observa que de los 39 plásmidos aislados, al menos 11 pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad. Cuando la bacteria contiene un plásmido que pertenece al grupo P-2 se observa menor susceptibilidad al telurito de potasio.

Los plásmidos de Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa confieren niveles comparables de resistencia (MIC 10^{-3} M) al telurito de potasio. Si se comparan las Tablas No. 46 y No. 47 se observa Ps. aeruginosa es 10 veces más resistente que E. coli.

De los plásmidos que confieren resistencia al telurito de potasio en Escherichia coli, pR477 y pR478 también confieren resistencia al arsenato y sales de mercurio, pR826 y pR828 codifican resistencia la arsenato, iones mercurícos y sales de mercurio, y pMG101 al nitrato de plata y sales de mercurio. Todos los plásmidos que codifican resistencia al telurito, aislados de Pseudomonas aeruginosa con excepción de los plásmidos CAM y CAM-OCT confieren también resistencia a iones mercurícos y algunos a acetato de fenil mercurio. Los plásmidos CAM y CAM-OCT de Ps. aeruginosa no codifican resistencia a antibióticos.

De los plásmidos aislados de Ps. aeruginosa y E. coli, el 10% codifican resistencia al telurato, pero ninguno a selenito o selenato.

Entre las Enterobacterias, es común la presencia de plásmidos que codifican resistencia al telurito.

to. La resistencia al telurito, no esta asociada a un solo grupo de incompatibilidad. La mayoría de los plásmidos "Ter" pertenecen a los grupos de incompatibilidad S, P-2 y otros.

En la tabla No. 47 se muestran los plásmidos aislados de *Escherichia coli* J53, así como la concentración mínima inhibitoria de telurito de potasio a la cual son susceptibles las bacterias que portan cada uno de los plásmidos aislados e identificados.

Tabla No. 47 Plásmidos que confieren resistencia al telurito de potasio aislados de <i>Escherichia coli</i> J53.			
Plásmidos	Grupo de Inc.	Fenotipo	MIC de K_2TeO_3
JJ1	FII	CmSmSpSuHgr	10^{-5}
R576	C(A-C)	ApCmGmKmSuHgr	10^{-3}
pMG101	?	ApCmSmSuTcAgzHgr	10^{-5}
JR211	C(A-C)	ApCmGmKmSmSuHgrPmr	10^{-5}
R476b	S	SmSuTcAszHgr	10^{-3}
R477	S	CmKmSmSuTcAszHgr	10^{-3}
R478	S	CmKmTcAszHgr	10^{-5}
R733	FI	SmTcAsz	10^{-3}
R826	S	ApCmGmKmSmTcAszHgr	10^{-3}
R828	S	ApCmGmKmSmTcAszHgrPmr	10^{-3}

En la Tabla anterior se observa que todos los plásmidos que se aíslan de *Escherichia coli* J53 codifican resistencia a otros metales y antibióticos.

La resistencia al telurio y sus derivados se codifica por plásmidos que pertenecen al grupo de incompatibilidad S, que recientemente se re clasifica dentro del

grupo H, el cual se subdivide en H₁ y H₂. Los subgrupos se diferencian por que los plásmidos que pertenecen a H₂ inhiben el desarrollo de algunos bacteriófagos (λ, T1, T5 y T7) a lo que se le llama "Inhibición fágica". Los plásmidos H1 carecen de esta propiedad.

Diane E. Taylor y Anne O. Summers observan que la resistencia al telurito (Ter) y la inhibición fágica (Phi) no son propiedades usuales. Ambas propiedades se presentan por todos los plásmidos del subgrupos H₂ excepto el plásmido pR476b. Estos investigadores realizan un estudio sobre la inhibición fágica en plásmidos "Ter". En la Tabla No. 48 se presentan los plásmidos que utilizan para su estudio (233).

Tabla No.48 Origen y Grupos de Incompatibilidad de los plásmidos aislados de diversos microorganismos.				
Plásmido	Grupo de Inc.	Fenotipo	Origen	
			Bacteria	Area geog.
pRG2251	H ₁	ApCmSmSpSuTc	<u>S. Typhi</u>	Tailandia
pSD114	H ₂	CmKmSmTcTer	<u>S. anatum</u>	Canada
pAs251-2	H ₂	CmKmSmTc	<u>S. typhimurium</u>	Canada
N-1	H ₂	SmSuTcHgr	<u>S. flexneri</u>	Japón
pSD-12	H ₂	CmTc	<u>S. typhimurium</u>	Canada
pSD-16	H ₂	KmSmTc	<u>S. typhimurium</u>	Canada
pSD274	H ₂	SmTc	<u>S. typhimurium</u>	Canada
TP116	H ₂	CmSmSuHgr	<u>S. typhi</u>	España
pWR23	H ₂	LacScr	<u>S. tennessee</u>	U.S.A.
MIP233	H ₂	Scr	<u>S. Ohio</u>	Inglaterra
MIP235	H ₂	LacCmSmSu	<u>S. oranienburg</u>	Brasil
R476b	H ₂	SmSuTcAsrHgr	<u>S. marcescens</u>	U.S.A.
R477-1	H ₂	SmSuTcAsrHgrTer	<u>S. marcescens</u>	U.S.A.
R826	H ₂	ApCmGmKmSmTcAsr	<u>S. marcescens</u>	Francia
R478	H ₂	CmKmTcAsrHgrTer	<u>S. marcescens</u>	U.S.A.
R828	H ₂	ApCmGmKmSmTer		
		AsrHgrPmr	<u>S. marcescens</u>	Francia

En la Tabla No. 48 se observa que solo 5 de los plásmidos que utilizan los investigadores codifican resistencia al telurito : pR477-1, pR478, pR826, pR828 y pSD114.

Los resultados que obtienen Taylor y Summers durante su estudio , se presentan en la tabla No. 49

Tabla No. 49 Resistencia al telurito e inhibición fágica mediada por plásmidos del grupo de incompatibilidad H ₂ .					
Plásmidos	MIC de K ₂ TeO ₃ (M)	Eficiencia de plaqueo con bacteriofagos			
		λ	T ₁	T ₅	T ₇
-	10 ⁻⁵				
pSD114	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	< 10 ⁻⁸	10 ⁻¹
pAS251-2	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	< 10 ⁻⁸	10 ⁻¹
N-1	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	< 10 ⁻⁸	10 ⁻¹
pSD12	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	< 10 ⁻⁷	10 ⁻¹
pSD16	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻¹
pSD274	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
TP116	10 ⁻³	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻⁸	10 ⁻¹
pWR23	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁸	0.5
MIP233	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
MIP235	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
R476b	10 ⁻³	1	1	1	1
R477-1	10 ⁻³	10 ⁻¹	0.5	0.5	10 ⁻¹
R478	10 ⁻³	10 ⁻¹	0.5	0.5	10 ⁻¹
R826	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁸	0.5
R828	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁸	0.5

Los resultados obtenidos en la tabla anterior indican que en todos los plásmidos del grupo de Inc. H₂ que codifican resistencia al telurito, hay inhibición fágica excepto en el plásmido R476b, en el que no están presentes ninguna de las dos características .

Summers y Taylor realizan el mismo estudio con bacterias aisladas de aguas residuales . El 95%

de las bacterias aisladas son resistentes al telurito ,mercurio, y plata .También se toman muestras de aguas residuales de la ciudad de Boston, en la que se encuentra un 10 % de bacterias telurito resistentes ,en aguas residuales de hospitales de la misma ciudad un 20 % son bacterias "Ter" !De las bacterias telurito resistentes el 80 % son Gram negativas .Los investigadores antes mencionados aislan 7 plásmidos que confieren resistencia al telurito y causan inhibición fágica en Escherichia coli AB1932-1 (Tabla No. 50)

Tabla No. 50 Inhibición Fágica mediada por plásmidos que confieren resistencia al telurito.

Plásmidos	Marcadores para resistencia	Eficiencia de plaqueo con bacteriofagos.		
		T ₁	T ₅	T ₇
-	-	1	1	1
pSD114	TerCmKmSmTc	10 ⁻⁶	<10 ⁻⁸	10 ⁻¹
RAS5002 ^c	TerHgrKmTcSm	10 ⁻⁶	<10 ⁻⁸	10 ⁻³
RAS5003 ^c	TerHgrCmKmTc	10 ⁻⁶	<10 ⁻⁸	10 ⁻³
RAS5005 ^d	Ter	10 ⁻⁶	<10 ⁻⁸	10 ⁻¹
RAS5007 ^e	TerHgr	10 ⁻⁶	<10 ⁻⁸	10 ⁻³
RAS5009 ^e	TerHgrPmr	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸
RAS5012 ^e	Ter HgrPmr	10 ⁻⁶	<10 ⁻⁸	10 ⁻⁴

- b Hospedador Escherichia coli AB1932-1
c Hospedador K. pneumoniae aislado de aguas residuales del Hospital General de Boston.
d Hospedador K. pneumoniae aislado de aguas residuales de la ciudad de Boston.
e Hospedador Citrobacter freundii aislado de aguas residuales de una industria procesadora de películas en New Bedford, Mass.

Los resultados que se presentan en la tabla anterior ,indican que todos los plásmidos aislados que confieren resistencia al telurito , también causan inhibición fágica.

Se muestra una menor eficiencia de plaqueo por el bacteriofago T₅, indicando que hay mayor inhibición fágica. Con estos resultados se demuestra que la inhibición fágica y la resistencia al telurito son transmitidas juntas por los plásmidos. Los dos marcadores no son específicos de los plásmidos del grupo H₂ y pueden estar asociados a otro tipo de plásmidos.

6. CONCLUSIONES.

Los microorganismos llevan acabo como mecanismos de resistencia , la transformación de los metales pesados (oxidación , reducción , metilación y dimetilación) o la degradación de compuestos orgánicos. Estos mecanismos de resistencia promueven cambios en la fisiología del microorganismo , que ayudan a su desintoxicación y la del medio ambiente.

Todas las transformaciones y los cambios fisiológicos de los microorganismos se codifican por medio de plásmidos y transposones .

Entre los metales pesados de gran importancia en la contaminación ambiental se encuentran el Hg, Cd,

Pb, Ni, Co, Cr, Cu, Va, Mo y Zn. Entre ellos, el mercurio, es sin duda el más importante, debido a que frecuentemente existen informes sobre intoxicaciones causadas por ingestión de alimentos y agua contaminados con el metal y sus derivados, los cuales pueden hasta causar la muerte.

Los microorganismos resistentes al mercurio utilizan como mecanismos de resistencia y desintoxicación las diversas transformaciones del metal, vía enzimática:

- Reducción de los iones Hg^{2+} a través de la enzima Mercurio Reductasa.
- Degradación de compuestos orgánicos del mercurio por medio de la enzima Organomercurio hidrolasa.
- Metilación de los iones Hg^{2+} , en presencia de Metilcobalamina y de la enzima Metilcobalamina Sintetasa, si es en condiciones de anaerobiosis. Cuando la transformación se lleva a cabo en condiciones de aerobiosis, el microorganismo no requiere de la enzima.

La resistencia de los microorganismos al mercurio se codifica por medio de plásmidos y transposones que contienen el operón Mer, formado por los genes: merA, merB, merR, merT, y merD.

En lo que respecta al Cadmio, los microorganismos resistentes a este metal únicamente llevan a cabo su metilación, además de presentar cambios fisiológicos, causando alteración en:

- La reducción del transporte de iones Cd^{2+}
- Aumento en el sistema de excreción de estos iones a través de la membrana celular.

El Cadmio se acumula en el citoplasma de los microorganismos resistentes y se encuentra ligado a proteínas formando Cadmio metaloproteínas. La formación de estas proteínas impide la inhibición del crecimiento del microorganismo. La presencia de proteínas en el citoplasma, la metilación de los iones Cd^{2+} y los cambios fisiológicos en los microorganismos, son conferidos por plásmidos que contienen los genes CadA y CadB.

La resistencia al Zinc, se relaciona con la existencia de plásmidos bacterianos que codifican la síntesis de un ácido graso (ácido ω -cicloheptil undecanoico) presente en la membrana celular, que impide el transporte de los iones zinc al interior de la célula.

Los microorganismos resistentes al Cromo son capaces de transformarlo a metilcromo, que es inestable y reacciona formando $Cr(III)$ y metano. Los iones Cr^{6+} son reducidos a Cr^{3+} .

En las bacterias resistentes al cobre se reporta la presencia de:

- una proteína T que inhibe la penetración de sustancias hidrofílicas con bajo peso molecular, en las que se incluye a este metal.
- una DNAasa extracelular, en la membrana celular.
- Metaloproteínas en el citoplasma, que se relacio-

nan con la proteína T.

Algunos microorganismos que habitan en sedimentos de ríos pueden llevar a cabo la metilación del plomo, otros microorganismos lo inmovilizan al penetrar en su interior.

Las bacterias resistentes al Estaño y Antimonio son capaces de transformar estos metales, en derivados orgánicos o bien los oxidan.

Aún no se conocen los mecanismos de resistencia al Cobalto, Plata, Vanadio, Tungsteno y Molibdeno, pero frecuentemente se aíslan bacterias resistentes a elevadas concentraciones de estos metales.

Los metaloides, como el Arsénico, Selenio, y Telurio son transformados vía microbiana. El As^{3+} es oxidado y el As^{5+} es metilado y dimetilado formando un compuesto con menor toxicidad, el ácido cacodílico, además los microorganismos sufren cambios fisiológicos:

- síntesis de proteínas que modifican la permeabilidad de la membrana celular a estos iones.
- sistema de excreción de los iones As, altamente específico.
- síntesis de enzimas intracelulares modificadas.

El Telurio y el Selenio son reducidos, asimilados y metilados. El selenio que se transporta al interior de los microorganismos, se incorpora a las proteínas formando: Selenio-metionina, Selenio-cisteína y Selenio Acetil CoA. El Telurio es reducido a través de la enzima Telurio reductasa.

Las transformaciones de todos los metales pesados son un mecanismo de desintoxicación para los microorganismos y el medio ambiente . Estas transformaciones dependen de: la concentración del metal , población microbiana , pH , temperatura , potencial de óxido-reducción en el medio , efectos de sinergismo o antagonismo de otros procesos metabólicos .

Algunos microorganismos utilizan estas transformaciones para la obtención de energía .

Las transformaciones de los metales vía microbiana , pueden ser utilizadas para el control de la contaminación ambiental , en países y ciudades con un alto índice de contaminación .

ANEXO I

CONCENTRACION HABITUAL DE LOS METALES PESADOS EN LA NATURALEZA		
Elemento	Agua de mar ($\mu\text{g}/\ell$)	Agua dulce ($\mu\text{g}/\ell$)
Antimonio	0.21	0.1
Arsénico	2.1	2.0
Cadmio	0.01(δ)	0.7
Cobalto	0.04	0.05
Cobre	0.1 - 0.04	1.8
Cromo	0.08(δ)	0.5
Estroncio	0.01	0.03
Mercurio	0.011	0.01(d)
Molibdeno	10.0	1.0
Níquel	0.2(δ)	0.3
	0.7(d)	-
Plata	0.01	0.3
Plomo	0.005-0.015	0.2
Selenio	0.04(δ)	0.19
Vanadio	1.9	0.9
Zinc	0.01(δ)	1.0
	0.62(d)	

s superficie del agua
d fondo del agua

ANEXO 11

Concentración de Metales Pesados en Agua Dulce.			
Metal	Concentración ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Localización	Año
Antimonio	0.1 - 31.2	Siberia	1961
	0.05- 0.8	Suecia	1965
	1.1 $\mu\text{g}/\text{l}$	E.U.A, Amazonas y Rhone.	1968
Arsénico	0.4 - 5	Río Waikato, N.Z.	1961
	0.45- 4.87	Río Columbia (U.S.A.)	1964
	1.7 $\mu\text{g}/\text{l}$	Japón	1965
	0.3 $\mu\text{g}/\text{l}$	Suecia	1965
		Grecia	1965
		Japón	1965
		U.S.A.	1971
	3.1 $\mu\text{g}/\text{l}$	Rhine	1971
	20 $\mu\text{g}/\text{l}$	U.S.A	1972
	3.2 $\mu\text{g}/\text{l}$	Danubio (F.R.G.)	1974
	3.7 $\mu\text{g}/\text{l}$	Lago constanza (Francia)	1974
	5.3 $\mu\text{g}/\text{l}$	Ruhr (F.G.G.)	1975
Cadmio	3 $\mu\text{g}/\text{l}$	Siberia	1961
	0.7 $\mu\text{g}/\text{l}$	California	1967
	0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$	Río Conway (Gales)	1971
	0.2 $\mu\text{g}/\text{l}$	Bahía Basín (N.Y.)	1971
		Gales	1972
	2.0 $\mu\text{g}/\text{l}$	Río Delaware	1972
		Australia	1973
		Rhine (F.R.G.)	1973
	1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$	Australia	1973
	0.8 $\mu\text{g}/\text{l}$	Río Missouri	1973
	0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$	Australia	1975
	2.7 $\mu\text{g}/\text{l}$	Ruhr (F.R.G.)	1975
0.2 $\mu\text{g}/\text{l}$	Pamir (Afganistan)	1976	
Cromo	0.2 $\mu\text{g}/\text{l}$	Maine (U.S.A.)	1956
	0.7 $\mu\text{g}/\text{l}$	California	1967
	1.4 $\mu\text{g}/\text{l}$	U.S.A., Rhone y Amazonas	1968
	1.2 $\mu\text{g}/\text{l}$	L. superior, Uron Erie, Ontario, U.S.A.	1969
	1.0 $\mu\text{g}/\text{l}$	U.S.A	1971

Metal	Concentración ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Localización	Año
3 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.3 - 69	Lago Michigan	1972
7.2 $\mu\text{g}/\text{L}$	3.0 - 18	Danubio (Ulm)	1974
5.7 $\mu\text{g}/\text{L}$	2.0 - 10	Lago Constanza	1974
25.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	10.0 - 115	Ruhr (F.R.G.)	1975
Cobalto			
0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.06 - 6.1	Connecticut	1966
0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$		California	1967
0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.03 - 0.85	Rio Neuse (U.S.A.)	1967
0.19 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.037 - 0.36	U.S.A., Rhone, Amazonas.	1968
0.04 $\mu\text{g}/\text{L}$		Lago Cayuga	1971
6.3 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.0 - 4,500	U.S.A.	1971
	5 - 11	Ruhr (F.R.G.)	1975
Cobre			
15 $\mu\text{g}/\text{L}$	8 - 29	Saale (G.D.R.)	1954
1.4 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.4 - 3.2	Japón	1955
1.9 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.5 - 7	Japón	1955
12 $\mu\text{g}/\text{L}$		Maine	1956
10.3 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.1 - 20,710	Siberia	1961
5.3 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.83 - 105	Norte de América	1963
3.8 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.7 - 27.5	Rio Columbia	1964
1.2 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.4 - 5	Sierra Nevada	1968
1.5 $\mu\text{g}/\text{L}$		Lago Erie	1969
10 $\mu\text{g}/\text{L}$		U.S.S.R.	1969
8.3 $\mu\text{g}/\text{L}$		Rhine (F.R.G.)	1971
0.7 $\mu\text{g}/\text{L}$		Lago Cayuga	1971
	0.7 - 5.5	Galles	1972
2 $\mu\text{g}/\text{L}$	1 - 10	Mackenzie, Canada	1972
3 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.3 - 52	Lago Michigan	1972
10 $\mu\text{g}/\text{L}$	5 - 26	Danubio (Austria)	1973
3 $\mu\text{g}/\text{L}$	0 - 31	Missuri	1973
40 $\mu\text{g}/\text{L}$	5 - 120	Kansas	1974
8.2 $\mu\text{g}/\text{L}$	4 - 19	Lago Constanza	1974
30 $\mu\text{g}/\text{L}$	22 - 70	Kuhr (F.R.G.)	1975
3 $\mu\text{g}/\text{L}$		Famir, Afganistan	1976
Estaño			
0.03 g/L		Maine	1960
0.09 g/L		Siberia	1961
Mercurio			
0.03 g/L	0.035 - 0.145	Rio Saale	1957
	0.01 - 0.05	Toscana y Latium	1968

Metal	Concentración ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Localización	Año
	0.006 - 0.515	Tames	1971
	0.030 - 0.075	Groenlandia	1971
	0.087 - 0.230	Groenlandia	1971
0.055 $\mu\text{g}/\text{l}$	0.02 - 2.8	Northamérica	
		U.S.A.	1972
	0.02 - 0.13	Lago Clay, Onta- rio	1973
0.18 $\mu\text{g}/\text{l}$	0.07 - 0.75	Danubio, Austria	1973
0.08 $\mu\text{g}/\text{l}$	0.02 - 0.38	Danubio (Regens- burg)	1974
0.18 $\mu\text{g}/\text{l}$	0.03 - 0.47	Lago Constanza	1974
0.03 $\mu\text{g}/\text{l}$	0.03 - 2.3	Ruhr (F.R.G.)	1975
MoLibdeno			
0.06 $\mu\text{g}/\text{l}$		Japón	1960
4 $\mu\text{g}/\text{l}$	1 - 5	Ríos de Califor- nia	1967
1.8 $\mu\text{g}/\text{l}$		U.S.A.	1968
0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$		Rhine	1972
7 $\mu\text{g}/\text{l}$		Lago Michigan	1972
Niquel			
0.4 $\mu\text{g}/\text{l}$		Maine (U.S.A.)	1956
10 $\mu\text{g}/\text{l}$	0 - 71	Norte de América	1963
3 $\mu\text{g}/\text{l}$	0.3 - 5	California	1967
19 $\mu\text{g}/\text{l}$	1 - 130	U.S.A.	1968
3.5 $\mu\text{g}/\text{l}$	2 - 5.6	L. Superior, Huron, Ontario	1969
	0.5 - 3.5	Gales	1972
27 $\mu\text{g}/\text{l}$	10 - 89	Kansas	1974
10 $\mu\text{g}/\text{l}$	2 - 17	Danubio (Regens- burg)	1974
5 $\mu\text{g}/\text{l}$	3 - 7	L. Constanza	1974
62 $\mu\text{g}/\text{l}$	35 - 100	Ruhr (F.R.G.)	1975
	3.2 - 6.9	Río. St. Lawrence	1976
Plomo			
2.6 $\mu\text{g}/\text{l}$		Maine	1956
3.9 $\mu\text{g}/\text{l}$	1.4 - 10.2	Saale, Elbe (G.D.R.)	1957
1.5 $\mu\text{g}/\text{l}$	0.1 - 2.071	Siberia	1961
4 $\mu\text{g}/\text{l}$	1 - 55	Norte de América	1963
0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$		Sierra Nevada	1968
2.7 $\mu\text{g}/\text{l}$	2.2 - 3.3	L. Superior, Huron, Ontario	1969
2 $\mu\text{g}/\text{l}$	1 - 890	U.S.A.	1971
2 $\mu\text{g}/\text{l}$		U.S.A.	1972

Metal		Concentración ($\mu\text{g}/\text{l}$)		Localización	Año	
Plata						
0.5	$\mu\text{g}/\text{l}$	0.2	-	3.5	Conecticut	1966
3.3	$\mu\text{g}/\text{l}$				Río Neuse (U.S.A.)	1967
		0.0	-	0.94	Norte América	1961
0.39	$\mu\text{g}/\text{l}$				U.S.A., Rhone, Amazonas	1968
Selenio						
0.2	$\mu\text{g}/\text{l}$	0.11	-	0.33	U.S.A., Rhone.	
					Amazonas	1968
2.4	$\mu\text{g}/\text{l}$	1	-	8	Danubio	1974
Zinc						
2.5	$\mu\text{g}/\text{l}$	0.25	-	34	Maine	1960
13	$\mu\text{g}/\text{l}$	0.1	-	5,770	Siberia	1961
29	$\mu\text{g}/\text{l}$	14	-	?	California	1967
1.5	$\mu\text{g}/\text{l}$	0.3	-	100	Sierra Nevada	1968
64	$\mu\text{g}/\text{l}$	2	-	1,183	U.S.A.	1968
39	$\mu\text{g}/\text{l}$				U.R.S.S.	1969
35	$\mu\text{g}/\text{l}$	11	-	71	L. Superior, Huron	
					Erie, Ontario	1969
20	$\mu\text{g}/\text{l}$	12	-	42,000	U.S.A.	1971
180	$\mu\text{g}/\text{l}$				Rhine (F.R.G.)	1971
3	$\mu\text{g}/\text{l}$				Lago Cayuga	1972
		11	-	60	Gales	1972
60	$\mu\text{g}/\text{l}$	3.6	-	176	Rhine (F.R.G.)	1972
4	$\mu\text{g}/\text{l}$	0.9	-	32	L. Michigan	1972
72	$\mu\text{g}/\text{l}$	21.	-	296	Danubio, Austria	1973
31	$\mu\text{g}/\text{l}$	3	-	140	Río Missouri	1973
70	$\mu\text{g}/\text{l}$	11	-	120	Danubio (Regensburg)	1974
37	$\mu\text{g}/\text{l}$	19	-	95	L. Constanza	1974
		3.5	-	40	Marbyrnong	1975
209	$\mu\text{g}/\text{l}$	100	-	300	Ruhr (F.R.G.)	1975
		29.2	-	32.5	Río St. Lawrence	1976

ANEXO III

ABREVIACIONES DE LOS GENES QUE PORTAN LOS PLASMIDOS

Fenotipo	Genotipo	Efecto
Ac	acr	Resistencia a la acridina
Ak	aacA	Resistencia a la Amikacina
Ap(A, Amp)	amp, bla	Resistencia a la ampicilina
Asa(AsO ₄ ²⁻)	asa	Resistencia al Arsenato
Asi(AsO ₃ ²⁻)	asi	Resistencia al Arsenito
Bi	bis	Resistencia al Bismuto
Bt	aphA	Resistencia a la Butirosina
Cam	cam	Biodegradación de Camfor
Cb	bla	Resistencia a la Carbenicilina
Cd	cad	Resistencia al Cadmio
Ce	bla	Resistencia a la Cefalaxina
Icx	icx(cfx, imm)	Inmunidad a la Colicina "X"
Caa(ColA)	caa	Producción de Colicina A
Cba(ColB)	cba	Producción de Colicina B
Cda(ColD)	cda	Producción de Colicina D
Ce1(Col E1)	cea	Producción de colicina E ₁
Ce2(Col E2)	ceb	Producción de Colicina E ₂
Ce3(Col E3)	cec	Producción de Colicina E ₃
Cia(ColIa)	cía	Producción de Colicina Ia
Cib(ColIb)	cib	Producción de Colicina Ib
Cha(ColK)	cka	Producción de Colicina K
Cva(ColV)	cva	Producción de Colicina V
Cxa(ColX)	cxa	Producción de Colicina X
Cm(C)	cat(cam)	Resistencia al cloramfenicol
Co	cob	Resistencia al ion cobaltoso
Cp	bla	Resistencia a la Cefalosporina
Cr	bla	Resistencia a la Cefaloridina
Cx	bla	Resistencia a la Cloxacilina
Dm	aacA	Resistencia a 3', 4'-Dideoxikanamicina B

Fenotipo	Genotipo	Efecto
Eb	Ebr	Resistencia al Bromuro de etidio
Eex(Sex, Sft)	eex(Tras, sex)	Exclusión de entrada
Em	erm(ero, ery)	Resistencia a la Eritromicina
Ent	ent	Producción de Enterotoxinas
Ext	ext	Producción de Toxina Esfoliativa
Fa	fus	Resistencia al ácido Fusídico
Fi ⁺ (X, fi ⁺)	fin	Inhibición de la conjugación transferida por medio de plásmidos "X"
Fi ⁻ (X, fi ⁻)		
Gm(G, Gk)	aacA(gat) aacB aacC aadB	Resistencia a la Gentamicina
Hg(Hg ²⁺)	mer	Resistencia al Mercurio, producción de la enzima Mercurio reductasa
Hly		Producción de Hemolisinas
Hys		Producción de Sulfito de Hidrogeno
Inc(Com, Mc, Mcr)		Determinación de Incompatibilidad Específica
Km(K)	apkA(kan)	Resistencia a la Kanamicina
Lv	aphA(lpt)	Resistencia a la Lividomicina
Mc	bla	Resistencia a la Meticilina
Mod	hsm	Modificación del DNA por la actividad de la Metilasa
Mod	hss	Modificación del DNA, requiriendo un sitio específico

Fenotipo	Genotipo	Efecto
		para la expresión de la actividad de ma Metilasa.
Mut		Actividad Mutatoria
Nah	nah	Biodegradación de Naftaleno
Nic	nic	Resistencia al ion Niqueloso
Nif		Fijación del Nitrogeno
Nm(N)	aphA(neo)	Resistencia a la Neomicina
Oct	oct	Biodegradación del octanol
Ox	bla	Resistencia a la Oxacilina
Pc(P)	bla, pen	Resistencia a la Penicilina
Phi		Interferencia en la producción de bacteriofagos
Phi	pi β	Interferencia de la propagación de T3 y T7 por F.
Phi		Interferencia de la propagación de los colifagos y T1 por plásmidos R
Phi		Interferencia de la propagación de T5 por Coli
Pil	tra	Síntesis de la estructura Pili
Pm	aphA	Resistencia a la Paromicina
Raf		Fermentación de la Rafinosa
Rep	rep	Replicación
Rep(Ts)	seg, tsr	Termosensible
Res	hsr	Restricción del DNA por la actividad de Endonucleasas
Res	hss	Restricción del DNA requiriendo un sitio específico para la expresión de la actividad de la endonucleasa
Rm	aphA	Resistencia a la Ribostamicina
Sal	sal	Biodegradación de Salicilatos
San		Producción de Antígeno de superficie

Fenotipo	Genotipo	Efecto
Sb	ant	Resistencia al antimonio
Seg	seg	Segregación de plásmidos
Sm(S)	aphC(spt, str)	Resistencia a la Estreptomina
	aadA(sas)	
Sp	aadA	Resistencia a la Espectomicina
Su(Sa)	sul	Resistencia a la Sulfonamida
Tc(T)	tet	Resistencia a la Tetraciclina
Tm	aacA	Resistencia a la Tobramicina
Tol	tol	Biodegradación del Tolueno
Tp	dhfr	Resistencia al Trimetoprim
Tra	tra(fer)	Mediación de la Conjugación
Uv	uvr	Resistencia a las radiaciones ultravioleta.

7 . BIBLIOGRAFIA

1. Ahluwalia ,G.S.,and,H.H.,Williams,1966 , "Alkaline Phosphatase Activity from Escherichia coli Grown on Selenite Media" ,Archives of Biochemistry and Biophysics,117:192-193.
2. Ahluwalia,G.S.,V.R.,Saxena,H.H.,Williams ,1968,"Quantitative Studies on Selenite Metabolism in Escherichia coli " , Archives of Biochemistry and Biophysics,124:79-84.
3. Akagi,H., and Takabatake,E.,1973," Heavy Metals " , Chemosphere, 3: 131-133.
4. Allen,J.R.L.,and,J.E.,Rae ,1986, "Time Sequence of Metal Pollution Severn Estuary , South Western UK " ,Marine Pollution Bulletin, 17:427-431.

5. Allen J.R.L., and, J.E., Rae, 1987, "Distribution of Cd, Cr, Cr, and Zn in Eastern Mediterranean Fishes ", *Marine Pollution Bulletin* , 18:45-49.
6. Alton, N.K., and, D.R., Vaprek, 1979, "Transcription and Translation of R-Plasmid R538-1 DNA", *Plasmid* , 3:366-373.
7. Andreae, O.M., and, D. Klumpff, 1979, "Biosynthesis and Release of Organoarsenic Compounds by Marine Algae", *Environmental Science and Technology* " , 13:738-740.
8. Arima, K., and, M., Beppud, 1964, 'Induction and Mechanisms of Arsenite Resistance in Pseudomonas pseudomallei ', *Journal of Bacteriology*, 88:143-150.
9. Bakir, F. et.al., 1973, "Methylmercury Poisoning in Iraq", *Science*, 181:230-240.
10. Bennet, P.H., et.al., 1978, "Characterisation of Tn105, a Transposon Determining Resistance to Mercuric Ions ", *Molecular General Genetic*, 159:101-106.
11. Bennett, R.L., and, M.H., Malamy, 1970, "Arsenate Resistant Mutants of Escherichia coli and Phosphate Transport", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40:496-503.
12. Berg, D.E., A., Weiss, and, L. Crossland, 1980, "Polarity on Tn5 Insertion Mutations in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology* , 142:439-446.
13. Birnboim, H.C., and, J. Doly, 1979, "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA ", *Nucleic Acids Research*, 7:1513-1523.

14. Blazey, D. L., and R. D. Burns, 1982, "Transcriptional Activity of the Transposable Element Tn10 in the Salmonella typhimurium ilvGEDA operon", Proc. Natl. Acad. Sci., 79:5011-5015.
15. Bolívar, F., 1985, "Transplante y Movilización de Genes", Ingeniería Genética Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
16. Bopp, I. H., A. M., Chakrabarty, and, H. L., Ehrlich, 1983, "Chromate Resistance Plasmid in Pseudomonas fluorescens", Journal of Bacteriology, 155:1105-1109.
17. Bowman, B. J., and C. W. Slayman, 1979, "The Effects of Vanadate on the Plasma Membrane ATP of Neurospora crassa", The Journal of Biological Chemistry, 254:2928-2934.
18. Bragg, P. D., 1970, "Reduction of Nonheme Iron in the Respiratory Chain of Escherichia coli", Can. Journal of Biochemistry, 48:777-783.
19. Bragg, P. D., and D. J. Rainnie, 1974, "The Effect of Silver Ions on the Respiratory Chain of Escherichia coli", Can. Journal of Microbiology, 20:883-889.
20. Braman, R. S., and C. Foreback, 1973, "Methylated Forms of Arsenic in the Environment", Science, 1982:1247-1249.
21. Bridges, K., et. al., 1979, "Gentamicin and Silver-Resistant Pseudomonas in a Burns Unit", British Medical Journal, 1:446-449.
22. Brierley, G. P., 1969, "Ion Transport by Heart Mitochondria", The Journal of Biological Chemistry, 242:115 - 112.
23. Brown, N. L., et. al., 1983, "Nucleotide Sequence of a Gene from the Pseudomonas Transposon Tn105 Encoding Mercuric Reductasa", Biochemistry, 22:4089-4095.

24. Bryson, V., and, W., Szybałski, 1952, "Microbial Selection", *Science*, 116:45-50.
25. Buchaver, J. M., 1973, "Contamination of Soil and Vegetation Near a Zinc Smelter by Zinc, Cadmium, Copper, and Lead", *Environmental Science and Technology*, 7:131-135.
26. Bull, T. A., and, M. P. ; H. Hea, 1978, "Companion to Microbiology. Selected Topics for Further Study", Published in U.S.A., by Longman Inc., New York, pág. 59-108.
27. Burgos, R. A., 1986, "Partículas Suspendidas", *Información Ciencia y Tecnología*, 8:22-23.
28. Burton, G. A., et. al., 1987, "High Incidence of Selenite-Resistant Bacteria from a Site Polluted with Selenium", *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:185-188.
29. Byard, J. L., 1969, "Trimethyl Selenide. A Urinary Metabolite of Selenite", *Arch. of Biochemistry and Biophysics*, 130:556-560.
30. Campbell, M. A., 1960, "How Viruses Insert Their DNA into the DNA of the Host Cell", *Scientific American*, 52: 103-112.
31. Cason, J. S., 1966, "Antiseptic and Aseptic Prophylaxis and of Isolators", *British Medical Journal*, 2:1288-1294.
32. Challenger, F., 1984, "Biological Methylation", Department of Organic Chemistry, The University, Leeds, Inglaterra, pág. 315-349.
33. Chakrabarty, A. M., 1972, "Genetic Bases os the Bioderadtión of Salicylate in Pseudomonas", *Journal of Bacteriology*, 112:815-823.
34. Chakrabarty, A. M., 1976, "Plasmids in Pseudomonas", *Ann. Rev. Genet.*, 10:7-30.

35. Chakrabarty, J. R., et. al., 1975, "Transformation of Pseudomonas putida and Escherichia coli with plasmid linked Drug-Resistance Factor DNA ", Proc. Nat. Acad. Sci., 72:3647-3651.
36. Chau, L. K., et. al., 1976, "Methylation of Selenium in the Aquatic Environment", Science, 192:1130-1131.
37. Chen, R., et. al., 1972, "A Low Molecular Weight Cadmium-Binding Protein in Testes of Rats : Possible Role in Cadmium-Induced Testicular Damage", Fed. Proc., 31:2699-2725.
38. Chetty, K. N., and, C. H., Hill, 1972, "In Vivo Interactions of Cobalt and Iron in Chicks ", Fed. Proc., 31:700, 2732.
39. Chopra, I., 1971, "Decreased Uptake of Cadmium by a Resistant Strain of Staphylococcus aureus", Journal of Gen. Microbiol., 63:265-267.
40. Chopra, I., 1975, "Mechanism of Plasmid-Mediated Resistance to Cadmium in Staphylococcus aureus", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7: 8-14.
41. Clark, L. O. D., A. A., Weiss, and, S, Silver, 1977, "Mercury and Organomercurial Resistance Determined by Plasmids in Pseudomonas", Journal of Bacteriology, 132:186-196.
42. Coleman, D. R., M: Falkimer, et. al., 1984, "Simultaneous Outbreaks of Infection Due to Serratia marcescens in General Hospital", J. Hosp. Infect., 5:270-282.
43. Compeau, C. G., and, R., Hartha, 1987, "Effect of Salinity on Mercury-Methylating Activity of Sulfate-Reducing Bacteria in Estuarine Sediments", Appl. Environ. Microbiol., 53:261-265.
44. Cooksey, A. R., 1987, "Characterization of a Copper Resistance Plasmid Conserved in Copper-Resistant Strains of Pseudomonas syringae pv. fomato", Appl. Environ. Microbiol., 53:454-456.

45. Cullen, W. R., C. Barry, B. McBride, and, W. Pickett, 1979, "The Transformation of Arsenicals by Candida humicola", *Can. J. Microbiol.*, 29:1201-1205.
46. Currier, T. C., and, E. W., Nester, 1976, "Isolation of Covalently Closed Circular DNA of High Molecular Weight from Bacteria", *Analytical Biochemistry*, 76:431-441.
47. Datta, N., and, P. T., Barth, 1976, "Compatibility Properties of R483, a Member of the I Plasmid Complex", *Journal of Bacteriology*, 125:796-799.
48. Davis, B. D., et. al., 1980, "Fisiología Microbiana. Tratado de Microbiología con Inclusión de Genética Molecular", Editorial Salvat S. A., Barcelona, España.
49. Davies, J., and, I. D., Smith, 1978, "Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Agents", *Ann. Rev. Microbiol.*, 32:469-518.
50. DiPaolo, R. V., et. al., 1972, "Copper Deficiency and Myelination in the New Born Rat", *Fed. Proc.*, 31:699, 2728.
51. Don, H. R., and, J. M., Pemberton, 1985, "Genetic and Physical Map of the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradative Plasmid pJP4", *Journal of Bacteriology*, 161:466-467.
52. Doran, J. W., 1982, "Microorganisms and the Biological Cycle of Selenio", *Adv. Microbiol. Ecol.*, 6:17-32.
53. Duxbury, T., 1981, "Toxicity of Heavy Metals to Soil Bacteria", *FEMS Microbiology Letters*, 11:217-220.
54. Dyke, K. G. H., H. T., Parker, and, M. H., Richmond, 1970, "Heavy Metals", *Journal of Medical Microbiology*, 3:125-136.

55. Eagon, R.G., and, M.A., Asbell, 1968, "Effect of Divalent Cations on the Uptake and Oxidation of Substrates by Pseudomonas aeruginosa", *Journal of Bacteriology*, 97: 812-819.
56. Echeverría, E., M.E., Mayandon, and E., Figuer, 1974, "Ecología y Salud", Colección Salud, Secretaría de Salubridad y Asistencia, Editorial Tlaloc, S.A., México, D.F..
57. Edgar, R.S., R.H., Epstein, 1965, "La genética de un virus bacteriano", *Cientifican American*, 56": 183-191.
58. Edwards, T., and, B.C., McBride, 1975, "Biosynthesis and Degradation of Methylmercury in Human Faeces", *Nature*, 253: 462-464.
59. Efstathiou, J.D. and, L.L., McKay, 1977, "Inorganic Salts Resistance Associated with a Lactose Fermenting Plasmid in Streptococcus lactis", *Journal of Bacteriology*, 130: 257-265.
60. Ehrlich, S.D., 1977, "Replication and Expression of plasmids from Staphylococcus aureus in Bacillus subtilis", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 1680-1682.
61. Emmel, C.T., 1975, "Ecología y Biología de Poblaciones", Editorial Interamericana, Primera edición, México, D.F..
62. Enoch, G.N., and, L.R., Lester, 1972, "Effects of Molybdate, Tungstate, and Selenium Compounds of Formate Dehydrogenasa and Other Enzyme Systems in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 110: 1032-1040.
63. Epstein, W., V., Whitelaw, and, J. Hesse, 1978, "A K^+ Transport ATPase in Escherichia coli", *The Journal of Biological Chemistry*, 253: 6666-6668.
64. Felds, G.I., and, H.V., Cheldelin, 1950, "Selenate Inhibition Studies. IV. Biochemical Basis of Selenate Toxicity in Yeast", *Science*, : 803-811.

65. Ferguson, J.F., and, J. Gams, 1972, "A Review of the Arsenic Cycle in Natural Waters", *Water Research*, 6:1259-1274.
66. Ferrara, R., and, S. Maserti, 1986, "Mercury in the Mediterranean Basin", *Marine Pollution Bulletin*, 17:533-534.
67. Fleming, R.W., and, M. Alexander, 1972, "Dimethylselenide and Dimethyl-telluride Formation by a Strain of *Penicillium*", *Appl. Microbiol.*, 24:424-429.
68. Fbrstner, V., and, G.T. Wittmann., 1979, "Metal Pollution in the Aquatic Environment", Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
69. Foster, J.T., 1983, "Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria", *Microbial Reviews*, 47:361-409.
70. Foster, J.T., and, F. Glinnity, 1985, "Some Mercurial Resistance Plasmids from Different Incompatibility Groups Specity merR Regulatory Fuctions that Both Repress and Induce the mer Operon of Plasmid R100", *Journal of Bacteriology*, 162:773-776.
71. Foster, J.T., and, H. Nakahara, 1979, "Deletions in Ther-Determinant mer Region of Plasmid R100-1 Selectes for Loss of Mercury Hipersensitivity", *Journal of Bacteriology*, 140:301-305.
72. Foster, J.T., H. Nakahara, A.A. Weiss, and, S. Silver., 1979, "Transposon A-Generated Mutations in the Mercuric Resistance Genes of Plasmid R100-1 ", *Journal of Bacteriology*, 140:167-181.
73. Foster, J.T., and, N.S. Willetts, 1977, "Characterisation of Transfer-Deficient Mutantas of the R100-1Tc^S plasmid pDU202 Caused by Insertion of Tn10", *Mol.Gen.Genet.*, 156:107-114.

74. Fox, B., and T. Ch. Walsh 1982, "Mercuric Reductase. Purification and Characterization of Transposon-Encoded Flavoprotein Containing an oxidation-Reduction-Active Disulfide", *The J. of Biological Chemistry*, 257: 2498-2503.
75. Furukawa, K., and K. Tonomura, 1972, "Metallic Mercury-Resistant Pseudomonas", *Agric. Biol. Chem.*, 36: 217-226.
76. Gardner, E. J., 1982, "Principios de Genética", Editorial Limusa, Quinta edición, México, D.F..
77. Gerrard, T. L., J. N., Telford, and H. H., Williams, 1974, "Detection of Selenium Deposits in Escherichia coli by Electron Microscopy", *Journal of Bacteriology*, 119: 1057-1060.
78. Girón, H. E., 1986, "El Cielo de mi Ciudad", *Información Científica y Tecnológica*, 8: 25-27.
79. González, E. E., 1986, "La Contaminación Muerte Lenta", *Información Científica y Tecnológica*, 8: 38-39.
80. Goodman, S. L., and Gilman, A., 1978, "Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Editorial Interamericana, Quinta edición, México, D.F., págs. 763-803.
81. Gravens, D. L., et. al., 1969, "Silver and Intestinal Flora", *Arch. Surg.*, 99: 454-458.
82. Goves, J. D., et. al., 1975, "Epidemiology of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria: Resistance Patterns in Staphylococci Isolated from Populations in Iraq Exposed and Not Exposed to Heavy Metals or Antibiotics", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7: 622-628.
83. Groves, J. D., and E. F., Young 1975, "Epidemiology of Antibiotic and Heavy Metals Resistance in Bacteria: Resistance Patterns

- in Staphylococci Isolated from Populations Not Known to be Exposed to Heavy Metals", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 7:614-621.
84. Halbach, S., and T.W. Clarkson , 1978 , " Enzymatic Oxidation of Mercury Vapor by Erythrocytes " , *Biochimica et Biophysica Acta* , 523:522-531.
 85. Hallas, L.E., J.C., Means , J.J., Cooney , 1982 , " Methylation of Tin by Estuarine Microorganisms" , *Science*, 215:1505-1507.
 86. Hamdy, H.K., and R.D., Noyes, 1975, "Formation of Methyl Mercury by Bacteria " , *Applied Microbiology* , 30 , 424-432.
 87. Hamilton, W.A., 1975, "Energy Coupling in Microbial Physiology, 12:1-48.
 88. Hansen, J.B., and R.H., Olsen , 1978, "Isolation of Large Bacterial Plasmids and Characterization of the P2 Incompatibility group Plasmids pMG1 and pMG5", *Journal of Bacteriology*, 135:227-238.
 89. Hardy, K., "Bacterial Plasmids", *Aspects of Microbiology*", No.4. Published in U.S.A. by American Society for Microbiology , Reprinted 1983.
 90. Haxington, J.S., 1859, "Contents of Cystine-Cysteine , Glutathion and Total Free Sulphydryl in Arsenic-Resistant and Sensitive Strains of the Blue Tinck, Boophilus decoloratus", *Nature* , 28:1739-1740.
 91. Harold, M.F., 1977, "Ion Currents and Physiological Functions in Microorganisms " , *Ann. Rev. Microbiol.*, 31:181-205.
 92. Hedges, W.R., and S., Baumberg , 1973 , "Resistance to Arsenic Compounds Conferred by a Plasmid Transmissible Between Strains of Escherichia coli " , *Journal of Bacteriology*, 115:459-460.

93. Hedges, W.R., and N., Datta, 1973, " R Factors from Proteus morganii ", Journal of General Microbiology, 77:249-259.
94. Hedges, W.R., V., Lemoine-Rodriguez, and N., Datta, 1975, " R Factors from Serratia marcescens ", Journal of General Microbiology, 86:88-92.
95. Hedges, W.R., J.T., Smith, and W., Jacob, 1974, "Properties of an R Factor from Bordetella bronchiseptica ", J.Gen.Microbiology, 84:199-204.
96. Hendry, A.T., and O.I., Stewart, O.I., 1979, "Silver Resistant Enterobacteriaceae from Hospital Patients", Can.J.Microbiol., 25:915-921.
97. Higham, D.P., and P.J., Sadler, 1984, "Cadmium-Resistant Pseudomonas putida Synthesizes Novel Cadmium Proteins", Science, 225:1043-1045.
98. Hippchen, B., A., Röll, and K., Poralla, 1981, "Occurrence in Soil of Thermo-Acidophilic Bacilli Possessing ω -Cyclohexane Fatty Acids and Hopanoids", Arch.Microbiol., 129:53-55.
99. Hiroyuki, H., et.al., 1986, "Plasmid-Determined Cadmium Resistance in Pseudomonas putida GAM-1 Isolated from soil", J.Bacteriology, 165:334-335.
100. Hirsch, C.A., et.al., 1963, "A Fumarate Reductase in Escherichia coli Distinct from Succinate Dehydrogenase", The Journal of Biological Chemistry, 238:3770-3774.
101. Hoepflich, D.P., et.al., 1960, "Tellurite Reduction as an Indicator of Potentially Pathogenic Staphylococci", J.Lab. and Clin.Med., 55:120-128.
102. Hoffman, E.L., and L.J., Hendry, 1976, "Inhibition of Thiobacillus ferrooxidans by Soluble Silver", Biotechnology and Bioengineering, XVIII:1161-1165.

103. Horitsu, H.H., and H., Kato, 1980, "Comparisons of Characteristics of Cadmium-Tolerant Bacterium, Pseudomonas aeruginosa G-1 and Its Cadmium-Sensitive Mutant Strain", *Agric. Biol. Chem.*, 44:777-782.
104. Ishihara, M., Y., Kamio, and Y., Terawaki, 1978, "Cupric Ion Resistance as a New Gene C Marker of a Temperature Sensitive R Plasmid, Rts1 in Escherichia coli", *Biochemical and Biophysical Research Comm.*, 82:74-80.
105. Iterson, W., and W., Leene, 1964, "A Cytochemical Localization of Reductive Sites in a Gram-Positive Bacterium", *The Journal of Cell Biology*, 20:361-375.
106. Iterson, Van. W., and W., Loene, 1964, "A Cytochemical Localization of Reductive Sites in a Gram-Negative Bacterium", *The Journal of Cell Biology*, 20:377-387.
107. Izaki, K., 1980, "Enzymatic Reduction of Mercurous and Mercuric Ions in Bacillus cereus", *Can. J. Microbiol.*, 27:192-197.
108. Jackson, J.W., and A.O., Summers, 1982, "Polypeptides Encoded by the mer Operon", *Journal of Bacteriology*, 149:479-487.
109. Jackson, J.W., and A.O., Summers, 1982, "Biochemical Characterization of HgCl₂ Inducible Polypeptides Encoded by the mer Operon of Plasmid R100", *Journal of Bacteriology*, 151:962-970.
110. Jacobs, R.M., et.al., 1972, "Temporal Changes in Quail Tissue element Concentrations on Exposure to Dietary Cd and Effects of Cd on Retention of Mineral elements", *Fed. Proc.* 31:699-700.
111. Jarvie, A.W., R.N., Markall, and H.R., Potter, 1975, "Chemical Alkylation of Lead", *Nature*, 255:217-218.

112. Jensen, S., and A., Jernelbv, 1969, "Biological Methylation of Mercury in Aquatic Organisms", *Nature*, 223: 753-754.
113. Jernelbv, A., and A., Martin, 1975, "Ecological Implications of Metal Metabolism by Microorganisms", *Ann. Rev. of Microbiol.*, 29: 61-77.
114. Jeter, M.R., R.S., Sias, and, L.J., Ingraham, 1984, "Chromosomal Location and Function of Genes Affecting Pseudomonas aeruginosa Nitrate Assimilation", *J. Bacteriology*, 157: 673-677.
115. Johnson, L.D., 1972, "Bacterial Reduction of Arsenate in Sea Water", *Journal of Bacteriology*, 240: 44-45.
116. Johnson, L.D., and, S.R., Braman, 1974, "Distribution of Atmospheric Mercury Species Near Ground", *Environmental Science and Technology*, 8: 1003-1009.
117. Jordan, M.J., and, M.P., Lechevalier, 1975, "Effects of Zinc-smelter Emissions on Forest Soil Microflora", *Can. J. Microbiol.*, 21: 1855-1865.
118. Kato, C.T., and, S.T., Liv, 1981, "Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids", *J. of Bacteriology*, 145: 1365-1373.
120. Kagi, J.H.R., and, B.L., Vallee, 1960, "Metallothionein: a Cadmium- and Zinc-Containing Protein from Equine Renal Cortex", *The Journal of Biological Chemistry*, 235: 3460-3465.
121. Kasahara, M., and, V., Anraku, 1972, "Inhibition of the Respiratory Chain of Escherichia coli by Zinc Ions", *J. Biol. Chem.*, 72: 777-781
122. Kinkle, B.K., J.S., Angle, and, H.H., Keyser, 1987, "Long-term Effects of Metal-Rich Sewage Sludge Application on Soil Populations of Bradyrhizomium japonicum", *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 315-319.

123. Kirkham, M. B., 1980, "Trace Elements in Sludge", *Science*, 144:1030.
124. Knowles, J. C., 1980, "Diversity of Bacterial Respiratory Systems, Vol. III, C. R. C., Press, Inc.
125. Komura, I., and, K. Izaqui, 1971, "Mechanism of Mercuric Chloride Resistance in Microorganisms. I. Vaporization of a Mercury Compound from Mercuric Chloride by Multiple Drug-Resistant Strains of Escherichia coli", *J. Biochemistry*, 70:885-893.
126. Komura, I., and, T. Funaba, 1971, "Mechanism of Mercuric Chloride Resistance in Microorganisms. II. NADPH-Dependent Reduction of Mercury Chloride by a Multiple Drug Resistant Strain of Escherichia coli", *J. Biochemistry*, 70:895-901.
127. Kondo, I., T., Ishikawa, and, H. Nakahara, 1974, "Mercury and Cadmium Resistances Mediated by the Penicillinase Plasmid in Staphylococcus aureus", *Journal of Bacteriology*, 117:1-7.
128. Kondo, I., H., Nakahara, and, T., Ishikawa, 1975, "The Possibility of a Specific Plasmid Mediating Metal Resistance", In S. Mitsuhashi and H. Hashimoto (ed), *Microbial Drug Resistance*. University of Tokyo Press, Tokyo, pag. 145-152.
129. Krauth-Siegel, R. L., et. al., 1982, "Glutathione Reductase from Human Erythrocytes. The Sequence of the NADPH Domain and of the Interface Domain", *Eur. J. Biochem.*, 121:259-267.
130. Laddaga, A. R., R., Bessen, and, S. Silver, 1985, "Cadmium-Resistant Mutant of Bacillus subtilis 168 with Reduced Cadmium Transport", *Journal of Bacteriology*, 162:1106-1110.
131. Laddaga, A. R., T. K., Mishra, and, S. Silver., 1987, "Nucleotide Sequence and Expression of the Mercurial-Resistance Operon from Staphylococcus aureus, Plasmid pI258", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:5106 -5110 .

132. Laddaga, R. A., and S. Silver, 1985, "Cadmium Uptake in Escherichia coli K-12", *Journal of Bacteriology*, 162: 1100-1105.
133. Lancey, R. W., 1980, "Rarity of Gene Transfer of Staphylococcus aureus in Vitro", *J. Gen. Microbiol.*, 119: 437-442.
134. LaRage, S. P., and S. Bascombs, 1986, "Use of Selenite Reducible in Bacterial Classification", *J. Appl. Bacteriol.*, 31: 568-580.
135. Larkin, M. G., et al., 1975, "Salmonella typhimurium Resistant to Silver Nitrate, Chloramphenicol and Ampicillin", *The Lancet*, Feb. 1: 235-239.
136. Lerch, K., 1980, "Copper Metallothionein, a Copper Binding Protein from Neurospora crassa", *Nature*, 284: 368-370.
137. Lester, R. L., and J. A. DeMoss, 1971, "Effects of Molybdate in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 105: 1006-1014.
138. Levine, W. G., 1978, "Metales Pesados y sus Antagonistas", *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Goodman Louis, Quinta edición, Editorial Interamericana, pág. 763-771.
139. Lowbury, G. J. L., et al., 1976, "tropical Chemoprophylaxis with Silver Sulphadiazine and Silver Nitrate Chlorhexidina Creams: Emergence of Sulphonamide-resistant Gram negative Bacilli", *British Medical Journal*, 1: 493-496.
140. Machtiger, N. A., and C. F. Fox, 1973, "Biochemistry of Bacterial Membranes", *Ann. Rev. Biochemistry*, 42: 572-600.
141. Mahler, I., S. H., Levinson, V., Wang, and O. H., Halvorson, 1986, "Cadmium and Mercury Resistant Bacillus Strains from a Salt Marsh and from Boston Harbor", *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 1293-1298.
142. Mandel, H. G., and J. S. Mayersak, 1962, "The Metabolisms and Actions of Arsenite in Microorganisms", *Fed. Proc.*, 21: 179.

143. MarE, J. I., 1968, "Incidence of R Factors Among Gram Negative Bacteria in Drug-free Human and Animal Communities", *Nature* 220:1046-1047.
144. Marques. M. A., F., Congregado, and, D. M., Simon-Pujol, 1979, "Antibiotic and Heavy Metal Resistance of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Soils", *J. Appl. bacteriol.*, 47:347-350.
145. Marshall, E., 1985, "Selenium Poisons Refuge, California Politics", *Science*, 229:144-146.
146. Marshall, E., 1986, "High Selenium Levels Confirmed in Six States", *Science*, 231:111.
147. McBride, B. C., and, R. S., Wolfe, 1971, "Biosynthesis of Dimethylarsine by Methanobacterium", *Biochemistry*, 10:4312-4317.
148. Miki, T., M. A., Easton, and, H. R., Rownd, 1978, "Mapping of Resistance Genes of the R Plasmid NR1", *Molec. Gen. Genet.*, 158:217-224.
149. Mitra, R. S., 1984, "Protein synthesis in Escherichia coli During Recovery from Exposure to Low Levels of Cd^{2+} ", *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:1012-1016.
150. Mitra, R. S., and, I. A., Bernstein, 1978, "Single-Strand Breakage in DNA of Escherichia coli Exposed to Cd^{2+} ", *Journal of Bacteriology*, 133:75-80.
151. Mitra, R. S., R. H., Gray, and, I. A., Bernstein, 1975, "Molecular Mechanisms of Accommodation in Escherichia coli to Levels of Cd^{2+} ", *Journal of Bacteriology*, 121:1180-1188.
152. Mobley, H. L. T., and, B. P., Rosen, 1982, "Energetics of Plasmid-Mediated Arsenate Resistance in Escherichia coli", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:6119-6122.
153. Morris, C. F., and, R., Rownd, 1974, "Transition of the R Factor R12 in Proteus mirabilis", *Journal of Bacteriology*, 118:867-879.

154. Norton, H. E., and, T. F., Anderson, 1979, "Electron Microscopic Studies of Biological Reactions. I. Reduction of Potassium Tellurite by Corynebacterium diphtheriae ", Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 64:272-276.
155. Murthy, L., et. al., 1972, "Effect of Cadmium on Ceruloplasmin (Copper Oxidase) Activity in Rats", Fed. Proc., 31:699-2726.
156. Nakahara, H., et. al., 1977, "Frequency of Heavy Metal Resistance in Bacteria from Impatients in Japan", J. Bacteriol., 266:165-167.
157. Nakahara, H., et. al., 1977, "Linkage of Mercury, Cadmium, and Arsenate and Drug Resistance in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa ", Appl. Environ. Microbiol., 33:975-976.
158. Nakahara, H., et. al., 1979, "Gene Copy Number Effects in the mer Operon of Plasmid NR1", Journal of Bacteriology, 138:284-287.
159. Nakahara, H., S. Silver, T., Miki, and, H., Rownd, 1979, "Hypersensitivity to Hg^{2+} and Hyperbinding Activity Associated with Cloned Fragments of the Mercurial Resistance Operon of Plasmid NR1", J. Bacteriology, 140:161-166.
160. Nakahara, H., and, H., Rownd, 1979, "Gene Copy Number Effects in the Opron mer ", Journal of Bacteriology, 138:284-287.
161. Nakai, Ch., H., Kamagamiyama, and, M., Nozaki, 1983, "Complete Nucleotide Sequence of the Metapyrocatechase Gene on the TOL Plasmid of Pseudomonas putida mt-2", J. Biol. Chem., 258:2923-2928.
162. Nelson, D. L., and, E. P., Kennedy, 1971, "Magnesium Transport in Escherichia coli ", J. Biol. Chem., 246:3042-3049.
163. Ni'Bhrian, N. N., S. Silver, J. T. Foster, 1983, "Tn5 Insertion Mutations in the Mercuric Ion Resistance Genes Derived from Plasmid R100", Journal of Bacteriology, 155:690-703.

164. Nicholls, P., and A. N. Malviya, 1968, "Inhibition of Nonphosphorylating Electron Transfer by Zinc", *Biochemistry*, 7:305-310.
165. Nielsen, F. H., 1972, "Effect of the Dietary Level of Nickel on the Responsiveness of Chicks to Changes in the Hormonal States", *Fed. Proc.*, 31:700.
166. Nies, D., et. al., 1987, "Cloning of Plasmid Genes Encoding Resistance to Cadmium, Zinc and Cobalt in Alcaligenes eutrophus CH34", *Journal of Bacteriology*, 169:4865-4868.
167. Nieto, J. J., A. Ventosa, and, F. Ruiz-Berraquero, 1987, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:1199-1209.
168. Nisioaka, H., 1973, "Mutagenic Activities of Metal Compounds in Bacteria", *Mutation Research*, 31:185-189.
169. Notton, B. A., and, E. J. Hewitt, 1974, "The Role of Tungsten in the Inhibition of Nitrate Reductase Activity in Spinach (*Spinacea oleracea*) Leaves, *Bioch. Biophys. Reserch. Comm.*, 44:702-710.
170. Novick, R. P., et. al., 1976, "Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids; a Proposal", *Bacteriological Reviews*, 40:166-189.
171. Novick, R. P., 1969, "Plasmidos", *Ciencia y Tecnología*, 50:1645.
172. Novick, R. P., et. al., 1979, "Penicillinase Plasmids of Staphylococcus aureus: Restriction Deletion Maps", *Plasmid*, 2:109-129.
173. Novick, R. P., and, Ch. Roth, 1968, "Plasmid-linked Resistance to Inorganic Salts in Staphylococcus aureus", *Journal of Bacteriology*, 95:1335-1342.
174. Ocampo, Z. M., 1986, "Inversión Térmica y Contaminación", *Información Científica y Tecnológica*, 8-19-20.

175. Ocaña, S.H.L., 1987, "Seguridad Laboral y Ciudadana", *CARDI (Revista Mexicana de Cardiología Aplicada)*, 12:321-322.
176. Odum, P.E., 1971, "Ecología", Editorial Interamericana, Tercera edición, México, D.F.
177. O'Halloran, T., and, Ch., Walsh., 1987, "Methalloregulatory DNA-Binding Protein Encoded by the merR Gene: Isolation and Characterization", *Science*, 235:213-214.
178. Oliver, B.G., 1973, "Heavy Metals Levels of Ottawa and Rideau River Sediments", *Environ. Science and Technology*, 7:135-137.
179. Olsen, H.R., P. Shipley, 1973, "Host Range and Properties of the Pseudomonas aeruginosa R Factor R1822", *Journal of Bacteriology*, 113:772-780.
180. Olson, H.B., T., Barkay, and, R.R., Colwell, 1979, "Role of Plasmid in Mercury Transformation by Bacteria Isolated from Aquatic Environment", *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:478-485.
181. Olson, J.G., D.F., Porter, J., Rubinst, and, S. Silver., 1982, "Mercuric Reductase Enzyme from a Mercury-Volatilizing Strain of Thiobacillus ferrooxidans", *Journal of Bacteriology*, 151:1230-1236.
182. O'Neal, G.S., B.D., Rhoads, and, E., Racker, 1979, "Vanadate Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase and other ATPases", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 89:845-850.
183. Osuna-Pérez, F., V.A., Botello, and, S., Villanueva, 1986, "Heavy Metals in Coatzacoalcos Estuary and Ostion Lagoon, México.", *Marine Pollution Bulletin*, 17:516-519.
184. Parris, G.E., and, F.E., Brinckman, 1976, "Reactions which to Environmental Mobility of Arsenic and Antimony II. Oxidation of

Arsenic and Antimony II. Oxidation of Trimethylarsine and trimethylstibine", Environ. Science and Technology, 10:1128-1133.

185. Pekarek, P.S., et. al., 1972, "Direct Determination of Serum Chromium and Nickel by an atomic Absorption Spectrophotometer with a Heated Graphite Furnace", Fed. Proc., 31:2730-2731.
186. Perry, D. R., and, S. Silver, 1982, "Cadmium and Manganese Transport in Staphylococcus aureus Membrane Vesicles", Journal of Bacteriology, 150:973-976.
187. Phillips, S. E., and, M. L., Taylor, 1976, "Oxidation of Arsenite to Arsenate by Acaligenes faecalis", Appl. Environ. Microbiol., 32:392-399.
188. Pickett, A. W., C., Barry, A. McBride, W. R., Cullen, and, H., Mansi, 1981, "The Reduction of Trimethylarsine Oxide by Candida humicola", Can. J. Microbiol., 27:773-778.
189. Porter, D. F., S., Silver, and, H., Nakahara, 1982, "selection for Mercurial Resistance in Hospital Settings", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 22:852-858.
190. Rabenstein, D. L., and, T. M., Fairhurst, 1975, "Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Solution Chemistry of Metal Complexes. XI The Binding of Methylmercury by Sulfhydryl Containing Amino Acids and by Glutathione ", J. Amer. Chem. Soc., 97:2086-2092.
191. Radford, A. J., J., Oliver, W. J., Kelly, and, C. D., Reaney, 1981, "Translocable Resistance to Mercuric and Phenylmercuric Ions in Soil Bacteria", Journal of Bacteriology, 147:1110-1112.

192. Richmond, M. H., and, M. John, 1964, "Co-transduction by Staphylococcal Phage of the Genes Responsible for Penicillinase Synthesis and Resistance to Mercury Salts", *Nature*, 202:1360-1361.
193. Rinderle, J. S., E. J., Booth, and, W. Williams, 1983, "Mercuric Reductase from R-Plasmid NR1: Characterization and Mechanistic Study", *Biochemistry*, 22: 869-876.
194. Ridley, P. W., L. J., and, J. M., Wood, 1977, "Biomethylation of Toxic Elements in the Environmental", *Science*, 197:329-332.
195. Robinson, B. J., and, D. H., Tuovine, 1984, "Mechanisms of Microbial Resistance of Mercury and Organomercury Compound: Physiological, Biochemical, and Genetic Analyses", *Microbial Reviews*, 48:95-124.
196. Rosa de M., A., Gambacorta, and, J., Bu'Lock, 1974, "Effects of pH and Temperature on the Fatty Acid Composition of Bacillus acidocaldarius", *Journal of Bacteriology*, 117:212-214.
197. Rosenberg, H. R. G., and, K., Chegwidde, 1977, "Two Systems for the Uptake of Phosphate in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 131:505-511.
198. Rothstein, A., 1959, "Cell Membrane as Site of Action of Heavy Metals", *Fed. Proc.*, 18:1026-1035.
199. Roussel, A. F., and, V. A., Chabbert, 1978, "Taxonomy and Epidemiology of Gram negative Bacterial Plasmids Studies by DNA-DNA Filter Hybridization in Formamide", *J. Gen. Microbiol.*, 104:269-276.
200. Rubens, C., F., Heffron, and, S., Falkow, 1976, "Transposition of a Plasmid Deoxyribonucleic Acid, Sequence that Mediates Ampicillin Resistance", *Journal of Bacteriology*, 128:425-434.
201. Rucher, R. B., 1972, "Metabolism and Properties of Soluble Elastin from Cu-Deficient Chicks", *Fed. Proc.*, 31:699.

202. Russell, L.M., and, H., Rosenberg, 1980, "The Nature of the Link between Potassium Transport and Phosphate Transport in Escherichia coli", *Biochemistry J.*, 188:715-723.
203. Salamanca, A.M., L., Chuecas, and, F. Carrasco, 1986, "Heavy Metals in Surface Sediments from Three Embayments of Central-South Chile", *Marine Pollution Bulletin*, 17:567-568.
204. Sancar, A., M.A., Hack, and, D.W., Rupp, 1979, "Simple Method for Identification of Plasmid-Coded Proteins", *Journal of Bacteriology*, 137:692-693.
205. Sarathchandra, S.U., and, J.H., Watkinson, 1981, "Oxidation of Elemental Selenium to Selenite by Bacillus megaterium", *Science*, 211:600-601.
206. Scala, J., and, H.H., Williams, 1963, "A Comparison of Selenite and Tellurite Toxicity in Escherichia coli", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 101:319-324.
207. Schmidt, U., and, F., Huber, 1976, "Methylation of Organolead and Lead(III) Compound to $[\text{CH}_3]_4\text{Pb}$ by Microorganisms", *Nature*, 259:157-158.
208. Schottel, J.L., 1978, "The Mercuric and Organomercurial Detoxifying Enzymes from a Plasmid-Bearing Strain of Escherichia coli", *J. Biol. Chem.*, 253:4341-4349.
209. Schottel, J.L., et.al., 1974, "Volatilisation of Mercury and Organomercurials Determined by Inducible R-Factor Systems in Enteric Bacteria", *Nature*, 251:335-337.
210. Schreurs, A.J.W., and, H., Rosenberg, 1982, "Effect of Silver on Transport and Retention of Phosphate by Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 152:7-13.

211. Shamberger, J.R., 1970, "Relationship of Selenium to Cancer", *Journal of National Cancer Institute*, 44:931-936.
212. Silver, S., et.al., 1981, "Inducible Plasmid-Determined Resistance to Arsenate, Arsenite, and Antimony(III), in Escherichia coli and Staphylococcus aureus", *Journal of Bacteriology*, 146:983-996.
213. Silver, S., and, D., Keach, 1982, "Energy-Dependent Arsenate Efflux: The Mechanism of Plasmid Mediated Resistance", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:6114-6115.
214. Silver, S., and, T.K., Misra, "Bacterial Transformations of and Resistances to Heavy Metals", Plenum Press, 1985.
215. Smith, H.D., 1967, "R Factors Mediate Resistance to Mercury, Nickel and, Cobalt", *Nature*, 156:1114-1115.
216. Smith, H., and P.R., Novick, 1972, "Genetic Studies on Plasmid-Linked Cadmium Resistance in Staphylococcus aureus", *Journal of Bacteriology*, 112:761-772.
217. Stadman, T.C., 1974, "Selenium Biochemistry", *Science*, 183:915-921.
218. Stanisich, A.V., 1974, "Interaction Between an R Factor and an Element Conferring Resistance to Mercuric Ions", *Molec. Gen. Genet.*, 128:201-212.
219. Stanisich, A.V., M.P., Bennett, and, H.M., Richmond, 1977, "Characterisation of a Translocation Unit Encoding Resistance to Mercuric Ions That Occurs on a Nonconjugative Plasmid in Pseudomonas aeruginosa", *Journal of Bacteriology*, 129:1227-1233.
220. Stanisich, V.A., and, J.M., Ortiz, 1976, "A Comparative Analysis of Plasmids of the P Incompatibility Group", *J. Gen. Micro.*,

77:103-108.

221. Steveninck, Van, J., 1966, "The Influence of Nickelous Ions on Carbohydrate Transport in Yeast Cells", *Biochem. Biophys. Acta*, 126:154-162.
222. Stewart, C. H., 1978, "Metales Pesados", *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Goodman, L. L. S., Quinta edición, Ed. Interamericana, pág. 772-790.
223. Stockdale, M., A. P., Dawson, and, A., Selwyn., 1970, "Effects of Trialkyltin and Triphenyltin Compounds on Mitochondrial Respiration", *Eur. J. Biochem.*, 15:342-351.
224. Summers, A. O., 1986, "Organization, Expression, and Evolution of Genes for Mercury Resistance", *Ann. Rev. Microbiol.*, 40:607-634.
225. Summers, A. O., and, A. G., Jacoby, 1977, "Plasmid-Determined Resistance To Tellurium Compounds", *Journal of Bacteriology*, 129: 276-281.
226. Summers, A. O., and, A. G., Jacoby, 1978, "Plasmid-Determined Resistance to Boron and Chromium Compounds in Pseudomonas aeruginosa", *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 13:637-640.
227. Summers, A. O., and, F. Lewis, 1973, "Volatilization of Mercuric Chloride by Mercury-Resistant Plasmid-Bearing Strains of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa", *Journal of Bacteriology*, 113: 1070-1072.
228. Summers, A. O., and, S. Silver, 1972, "Mercury Resistance in Plasmid Bearing Strain of Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 112:1228-1236.

229. Summers, A. O., and, S. Silver, 1978, "Microbial Transformations of Metals", *Ann. Rev. Microbiol.*, 32:637-673.
230. Summers, A. O., and, I. L., Sugarman, 1974, "Cell-Free Mercury(II) Reducing Activity in a Plasmid-Bearing Strain of Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 119:249-259.
231. Suzuki, I., 1974, "Iron Oxidation", *Ann. Rev. Microbiol.*, 28:85-101.
232. Tanaka, M., T. Yamamoto, and, T. Sawai, 1983, "Evolution of Complex Resistance Transposons from an Ancestral Mercurial Transposon", *Journal of Bacteriology*, 153:1432-1438.
233. Taylor, E. D., and, A. O., Summers, 1979, "Association of Tellurium Resistance and Bacteriophage Inhibition Conferred by R Plasmids", *Journal of Bacteriology*, 137:1430-1433.
234. Terai, T., T. Kamahora, and, Y. Yamamura., 1968, "Tellurite Reductase From Mycobacterium Avium", *Journal of Bacteriology*, 75:535-539.
235. Tetaz, J. T., and, K. J. R., Luke, 1983, "Plasmid-Controlled Resistance to Copper in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 154:1263-1268.
236. Tezuka, T., and, T. Kenzo, 1978, "Purification and Properties of a Second Enzyme Catalyzing the Splitting of Carbon-Mercury Linkages from Mercury Resistant Pseudomonas K-62", *Journal of Bacteriology*, 135:138-143.
237. Thompson, J. S., and, M. W., Thompson, 1982, "Genética Médica", editorial Salvat, Barcelona, España, 2ª edición, pág. 65-89.
238. Timoney, F. J., J. Port, J. Giles, and, J. Spanier, 1978, "Heavy-Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sedimen-

- ts of New York Bight", *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:465-472.
239. Tomás, M. J., and, W. W., Kay, 1986, "Tellurite Susceptibility and Non-Plasmid Mediated Resistance in Escherichia coli", *Ant. Agent. Chemo.*, 30:127-131.
240. Tonomura, K., et. al., 1968, "Stimulative Vaporization of Phenyl-mercuric Acetate by Mercury-Resistant Bacteria", *Nature*, 217: 644-646.
241. Tonomura, K., and, F. Kanzaki, 1969, "The Reductive Decomposition of Organic Mercurials by Cell-free Extract of a Mercury Resistant Pseudomonad", *Biochim. Biophys. Acta.*, 184:227-229.
242. Tornabene, T. G., and, H. W., Edwards, 1972, "Microbial Uptake of Lead", *Science*, 1976:1334-1335.
243. Trevors, J. T., and, K. M., Oddie, 1986, "Metal Resistencial in Bacteria", *F. E. M. S., Microbial Rev.*, 32:39-54.
244. Tucker, L. F., F. J., Walper, D. M., Appleman, and, J., Donohue, 1962, "Complete Reduction of Tellurite to Pure Tellurium Metal by Microorganisms", *Journal of Bacteriology*, 83:1313-1314.
245. Turner, A. W., et. al., 1949, "Bacterial Oxidation of Arsenite", *Nature*, 76-77.
246. Tuve, T., and, H. H., Williams, 1961, "Metabolism of Selenium by Escherichia coli: Biosynthesis of Selenomethionine", *J. Biol. Chem.*, 236:597-601.
247. Tyneka, Z. G., and, J. Zajac., 1981, "Energy-Dependent Efflux of Cadmium Coded by a Plasmid Resistance Determinant in Staphylococcus aureus", *Journal of Bacteriology*, 147:313-319.
248. Tyneka, Z. G., and, J., Zajac, "1981", Reduce Cadmium Transport Determined by a Resistance Plasmid in Staphylococcus aureus

- Journal of Bacteriology*, 147:305-312.
249. Valle, L. B., and, D. D., Ulmer, 1972, "Biochemical Effects of Mercury, Cadmium, and Lead ", *Arch. Biochem. Biophys.* , 91:117.
 250. Villegas, R. A. , 1986, "El Aire Nuestro de Cada Día", *Información Científica y Tecnológica* , 8:17-18.
 251. Wang, Y. , I. Mahler, H. S. , Levinson, and, H. D. , Halvorson, 1987, "Cloning and Expression in Escherichia coli of Chromosomal Mercury Resistance Genes from Bacillus spp.", *Journal of Bacteriology*, 169:4848-4851.
 252. Webb, M. , 1968, "The Influence of Certain Trace Metals on Bacterial Growth and Magnesium Utilization", *Journal of General Microbiology*, 51:325-335.
 253. Webb, . , 1970, "Interrelationships Between the Utilization of Magnesium and the Uptake of the Other Bivalent Cations by Bacteria", *Biochem. Biophys. Acta.* , 222:428-439.
 254. Webb, M. , 1970, "The Mechanism of Acquired Resistance to Co^{2+} and Ni^{2+} in Gram Positive and Gram Negative Bacteria" , *Biochim. Biophys. Acta.* , 222:440-446.
 255. Weiss, A. A. , D. S. , Murphy, and, S. Silver , 1977, "Mercury and Organomercurial Resistance Determined by Plasmid in Staphylococcus aureus", *Journal of Bacteriology*, 132:197-208.
 256. Weiss, A. A. , S. Silver, and, T. G. , Kinscherf, 1978, "Cation Transport Alteration Associated with Plasmid-Determined Resistance to Cadmium in Staphylococcus aureus", *Ant. Agent. Chemo.* , 14:856-865.
 257. Williams, J. , and, L. D. CH. , 1982 , "Aminoacid Sequence Homology Between Pig Heart Lipamide Deshydrogenase and Human Erythrocyte Glutathione Reductasa", *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 79:2199-2201.

258. Williams, S., 1978, "Arsenic Resistance in Enterobacteria: Its Transmission by Conjugation and by Phage", *J. Gen. Microbiol.*, 109:49-56.
259. Willisky, G. R., and, M. H., Malamy, 1980, "Characterization of Two Genetically Separable Inorganic Phosphate Transport Systems in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 144:356-365.
260. Willisky, G. R., and, M. H., Malamy, 1980, "Effect of Arsenate on Inorganic Phosphate Transport in Escherichia coli", *Journal of Bacteriology*, 144:366-374.
261. Witte, W., et. al., 1986, "Resistance to Mercury and to Cadmium in Chromosomally Resistant Staphylococcus aureus", *Ant. Agen. Chem.*, 29:663-669.
262. Wong, A. T. S., Chau, Y. K., and , P. L., Luxon, 1975, "Methylation of Lead in the Environment", *Nature*, 253:263-264.
263. Wood, J. M., 1974, "Biological Cycles for Toxic Elements in the Environment", *Science*, 183:1049-1052.
264. Wood, J. M., F. S., Kennedy , and, G. C., Rosen, 1968, "Synthesis of Methyl-Mercury Compounds by Extracts of Methanogenic Bacterium", *Nature* , 220:173-174.
265. Yamamoto, T., M. Tanaka, et. al., 1981, "Transposition of Oxacillin Hydrolyzing Penicillinase Gene", *Journal of Bacteriology*, 145:808-813.
266. Zehr, J. P., and, R. S., Oremland, 1987, "Reduction of Selenate to Selenide by Sulfate-Respiring Bacteria: Experiments with Cell Suspensions and Estuarine Sediments", *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:1365-1369.

267. Zinder, D.N., 1958, "Trnasduction in Bacteria", *Ciencia y Tecnologia*, 67: 36-41.
268. *Ecología 100 Acciones Necesarias*, Enero 1987, Folleto de la Comisión Nacional de Ecología.
269. *El Estado del Medio Ambiente 1981*", Folleto de la Secretaria de Salubridad y Asistencia, Subsecretaria del Mejoramiento del Ambiente, Talleres Gráficos de la Nación, México, D.F..