

**DETERMINACION DE PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS  
Y DERIVADOS MERCURIALES EN CEPAS AISLADAS DE LA E.S.E.  
CLÍNICA HENRIQUE DE LA VEGA CARTAGENA COLOMBIA.**

*PASANTIA REALIZADA  
EN EL GRUPO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
CARTAGENA - COLOMBIA*

**ALFONSO CARLOS BETTIN MARTINEZ  
ELKIN JOHAN PRIETO MENDOZA**

**AREA DE PROFUNDIZACIÓN:  
Microbiología**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
SINCELEJO – COLOMBIA  
2007**

**DETERMINACION DE PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS  
Y DERIVADOS MERCURIALES EN CEPAS AISLADAS DE LA E.S.E  
CLÍNICA HENRIQUE DE LA VEGA .CARTAGENA COLOMBIA.**

*PASANTIA REALIZADA  
EN EL GRUPO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
CARTAGENA - COLOMBIA*

**ALFONSO CARLOS BETTIN MARTINEZ  
ELKIN JOHAN PRIETO MENDOZA**

**AREA DE PROFUNDIZACIÓN:  
Microbiología**

**DIRECTOR:  
OCTAVIO ARZUZA NAVARRO Ph.D.**

**CODIRECTOR:  
BÁRBARA ARROYO SALGADO. M.Sc.  
Universidad de Cartagena**

**CODIRECTOR:  
MARCELA MARTÍNEZ MIRANDA. M.Sc.  
Universidad de Sucre**

**TUTORA: ANA C. BARRETO. M.Sc**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
SINCELEJO – COLOMBIA**

**2007**

*Doy gracias a Dios por su inmensa compañía y enseñanza en mi formación diaria.*

*A mi madre, Escilda Maria sin tu esfuerzo y amor no hubiese sido posible alcanzar este triunfo en mi vida.*

*A mi padre y hermanos del alma William, Albertico, Mabel, Marlith, Juan Manuel, Nestor, Aldemar, Lorena, Robert e Idailda quienes creyeron y me apoyaron incondicionalmente aportando su granito de arena para lograr esta meta.*

*Maria Jose... tu llegada me enseñó que la Vida es Bella...*

*Gracias a todos por su ayuda.*

*Alfonso Bettin M.*

*Agradezco de todo corazón a Dios por bendecirme y ser mi guía.*

*A mis padres Carmen y Moisés quienes con su amor y e. fuerza hicieron posible alcanzar este logro mas en mi vida.*

*A mis queridos hermanos Erwin y Erickelly y demás familiares por su gran cariño y comprensión.*

*A mi poch y por su compañía, amor y apoyo incondicional.*

*Y gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible alcanzar este gran logro.*

*Muchas gracias.*

*Elkin Prieto M.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad de Sucre por formarnos como profesionales.*

*Al Doctor Octavio Arzuza y la Dra. Bárbara Arroyo por consolidar en nosotros la vocación científica, al permitirnos realizar la pasantía en su grupo de investigación.*

*A nuestra tutora y amiga Ana Caro por su colaboración y apoyo.*

*A todo el personal del grupo de investigación en Microbiología de la Universidad de Cartagena, Kitty, Martha, Goyo, y Alex, los cuales nos brindaron su colaboración y orientación cuando así lo solicitamos.*

*A nuestros profesores y amigos a quienes enormemente les agradecemos sus enseñanzas durante nuestra carrera, Santiago, Erick, Juan Manuel, Consuegra, Eduardo...*

*A la profesora Marcela Miranda por su colaboración personal, siempre estaremos agradecidos.*

*A nuestros amigos y compañeros que siempre estuvieron con nosotros, Rafa, Mayo, Jesús, Jorge, Luis, Carmen, Ever, Alex, Ana milena, Paola, Julio, Oscar, Cristian, Yiris, Margareth, Lucho, Juancho, Vivian, Yina, Nando, Never, Nelly, Yosed, Gustavo, Lili, Arturo, Charlis, Yulenis...*

*Ya todos aquéllos que colaboraron en la realización de este trabajo.*

## INTRODUCCION

La Universidad de Sucre, como institución de educación superior, fomenta la formación científica e investigativa de sus estudiantes, al establecer vínculos interinstitucionales para la cooperación académica complementaria y adquisición de nuevas habilidades, que contribuyan a la formación de un espíritu científico, a través del fortalecimiento de los conocimientos básicos y experimentales de las diferentes metodologías y tópicos de vanguardia aplicados en áreas biotecnológicas, microbiológicas, entre otras.

Una de las formas para establecer cooperación académica es mediante la modalidad de pasantía, que para el presente caso fue ofertada dada la existencia del convenio vigente entre la Universidad de Sucre y la Universidad de Cartagena, específicamente, la Maestría de Microbiología con su Grupo de Microbiología Clínica y Ambiental, reconocido por COLCIENCIAS. Esto nos permitió la oportunidad de realizar un entrenamiento en la estandarización de metodologías diagnósticas microbiológicas durante un periodo de aproximadamente doce meses dentro del marco del proyecto **“CARACTERIZACION FILOGENETICA DE LA FLORA BACTERIANA BENTONICA RESISTENTE A METALES PESADOS Y ANTIBIOTICOS EN LA COSTA ATLANTICA COLOMBIANA”** que ofrecía la oportunidad para dicha capacitación.

La pasantía se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Medicina, Laboratorio de Investigaciones de la Maestría en Microbiología y estuvo centrada principalmente en las áreas de Microbiología básica y aplicada.

La pasantía estuvo enmarcada dentro del proyecto de investigación que busca datos con relación a la magnitud de la contaminación microbiana marina en la Costa Atlántica Colombiana, en términos de bacterias

resistentes a antibióticos y metales, cuantificando la presencia de estos microorganismos en esta zona costera de gran importancia económica para el desarrollo del país, de tal forma que podamos poseer una idea del riesgo epidemiológico a la salud pública asociado con el uso de estos recursos y reconocer el pasivo ambiental, social y económico que genera este hecho.

En este sentido el proyecto en mención fue la fuente para establecer el objetivo general de la pasantía:

Profundizar en los conocimientos, teóricos y prácticos, conducentes a la apropiación de conocimientos nuevos, adquisición de habilidades en el manejo de metodologías microbiológicas en los laboratorios de la Maestría de Microbiología de la Universidad de Cartagena.

De igual forma para alcanzar el objetivo general se plantearon unos objetivos específicos:

- Apropiar conocimientos teóricos en los avances de la Microbiología básica aplicados a la carrera de Biología.
- Adquirir destrezas en el manejo de cultivos *in vitro*, mantenimiento e identificación de microorganismos, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y resistencia a derivados mercuriales.
- Fortalecer la vocación por la investigación científica.

## **CAPITULO 1.**

### **Informe crítico.**

Los antibióticos son sustancias químicas de bajo peso molecular derivadas de otros microorganismos o sintetizadas químicamente; la enorme producción mundial de antibióticos para el tratamiento de infecciones en humanos y animales y el uso de estas sustancias en la producción animal, ha llevado a que en la actualidad los antibióticos ejercen una gran presión selectiva en el mundo microbiano, con el consecuente desarrollo y diseminación de poblaciones de bacterias resistentes. (Restrepo *et al.*, 2003).

Las infecciones adquiridas por microorganismos que son resistentes a múltiples agentes antibacterianos tanto en la comunidad como en hospitales probablemente incrementan la morbilidad, mortalidad y el costo en el cuidado de la salud. Conllevando a la llamada crisis mundial para los hospitales y centros de salud pública y privado (Ward *et al.*, 2005).

Otros factores importantes en la emergencia de la resistencia incluyen la prevalencia de genes resistentes y los cambios sociales y tecnológicos que potencian la transmisión de organismos resistentes dentro de los hospitales, entre los hospitales y entre países (Atencio-Bracho *et al.*, 2005).

La resistencia bacteriana puede resultar de modificar el objetivo del antimicrobiano, causar impermeabilidad, expulsión o desactivación enzimática. Algunas bacterias son inherentes a la resistencia; otras pueden ser resistentes por inserción vía mutación o por transferencia horizontal de genes por plásmidos, transposones y bacteriófagos lisogénicos (Livermore., 2003).

Dentro de los principales patógenos asociados a la aparición de resistencia antimicrobiana se incluyen, *Staphylococcus aureus*, que se caracteriza por ser un patógeno que puede causar en los humanos diferentes tipos de infecciones que van desde faringoamigdalitis, otitis, celulitis, bacteriemia, síndrome de la piel escaldada, síndrome del choque tóxico entre otros (Adebayo y Johnson., 2006). Se ha reportado que *Staphylococcus aureus* posee la capacidad de producir más de 30 diferentes factores de patogenicidad, entre los cuales se pueden mencionar la presencia de capsula, proteína A, adhesinas, hemolisinas, toxina exfoliativa, toxina 1 del síndrome del choque tóxico (TSST-1), coagulasa, etc (Paniagua *et al.*, 2003).

El tratamiento de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* constituye actualmente un grave problema para los médicos y especialistas, debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a los principales grupos de antibióticos, situación a la que ha contribuido el hombre debido al uso indiscriminado de estos agentes. (Paniagua *et al.*, 2003; Adebayo y Johnson *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2007).

Por otra parte, numerosos trabajos mencionan el aislamiento de cepas de *Escherichia coli* con resistencia incrementada a la combinación de varios antibióticos siendo muchas de ellas de origen clínico. (Nascimento *et al.*, 1999; Narváez *et al.*, 2005), lo cual dificulta la elección de la terapia antimicrobiana; mas aun cuando se sabe que las enterobacterias producen la variedad mas amplia de infecciones causadas por cualquier grupo de agentes microbianos, entre ellas, infecciones de vías urinarias (IVU) y diarrea aguda. Las bacterias de esta familia son, con gran ventaja, la causa mas frecuente de IVU y la especie principal es *Escherichia coli*. (Ryan K & Ray G. 2004; Yüksel., 2006).

En 2007 reportaron que la prevalencia de resistencia antibióticos en *Escherichia coli* de diferentes partes del mundo fue altamente variable. La prevalencia reportada en estudios de Centro y Sur América, España y Turquía fue mucho más alta que la reportada en Estados Unidos y Europa Central. Además, una tendencia hacia la alta prevalencia de resistencia fue observada en los últimos años (Erb *et al.*, 2007)

Otros miembros de la familia enterobacteriaceae son capaces de producir infecciones oportunistas del tipo producido por *Escherichia coli* descrito con anterioridad; la especie mas frecuente *Klebsiella pneumoniae* es capaz de producir neumonía lobar clásica, que es una característica de otras bacterias encapsuladas. La mayor parte de las neumonías por *Klebsiella* son indistinguibles de las producidas por otros miembros de las enterobacterias. De todas estas, las especies de *Klebsiella* se encuentran en la actualidad entre las más resistentes a los agentes antimicrobianos (Ryan K & Ray G. 2004; Reyes *et al.*, 2007).

Otros de los patógenos oportunistas asociados con resistencia antimicrobiana y que constituye un factor principal para esta prevalencia en ambientes hospitalarios es *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes-Vega. 1987; Saha *et al.* 2006; Reyes *et al.*, 2007).

La adquisición de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital es rápida, cerca de un 30% de pacientes puede excretar el organismo dentro de dos días de admisión. (Medical Microbiology; Greenwood *et al.*, 15<sup>ed</sup>, 1997).

Diversas especies de *Pseudomonas aeruginosa* pueden producir cualquiera de las infecciones extraintestinales oportunistas causadas por miembros de la familia enterobacteriaceae, así como infecciones de quemaduras, heridas, vías urinarias, piel, ojos, oídos y respiratorias que pueden progresar hasta bacteriemia (Ryan K & Ray G. 2004; Reyes *et al.*, 2007).

Todos los microorganismos mencionados y además de otros patógenos, pueden estar asociados con resistencia a metales pesados.

Así como se ha descrito que el amplio uso de los antibióticos constituye el principal factor de selección de resistencia bacteriana a estos compuestos; también puede actuar como un importante factor secundario en la selección de bacterias resistentes a metales pesados, debido a que se ha reportado que un mismo plásmido puede contener genes capaces de conferir resistencia a antibióticos y genes que confieren resistencia a metales pesados. (Nakahara *et al.*, 1977b; Firth Neville *et al.*, 2000).

De acuerdo con varios autores, la resistencia a antibióticos puede ser mayor en sedimentos contaminados con metales que en sitios con baja contaminación (Rasmussen y Sorensen., 1998; Roane y Kellogg, 1996). Además, de gran importancia es el hecho que bacterias resistentes a contaminación con metales son también resistentes a antibióticos (Verma *et al.*, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2000), en particular algunas especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Staphylococcus*, entre otras (Filali *et al.*, 2000). Dentro de los antibióticos más comunes que han sido reportados como inductores de resistencia en bacterias aparecen la penicilina, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, Kanamicina, ácido nalidíxico, neomicina y estreptomina, entre otros (Boon y Cattanach, 1999; Miranda y Castillo, 1998). Esta resistencia ha estado asociada con plásmidos que confieren resistencia al mercurio en ecosistemas marinos y en comunidades bacterianas (Dahlberg *et al.*, 1997; Dahlberg *et al.*, 1998).

Desde el hallazgo del primer plásmido R 100 que contiene genes de resistencia a varias drogas y al mercurio se demostró, que existen procesos biológicos que aumentan la presión evolutiva sin que participen antimicrobianos. De este modo gran parte de los genes de resistencia considerados como plasmídicos o cromosómicos están ubicados en

transposones e integrones.; ejemplo de esto es la resistencia al  $\text{Hg}^{2+}$  codificada por el plásmido R 100 que se ubica en el transposon Tn21. De este modo la presencia de plasmidos conjugativos se considera que juega un papel importante en la transferencia horizontal de genes de resistencia de una bacteria a otra de la misma especie, de distinta especie, e incluso de géneros diferentes (Paniagua *et al.*, 2003).

Por otra parte la resistencia a los antibióticos aumenta en la medida que nos aproximamos al sitio de confluencia con los efluentes contaminantes, correlacionado positivamente con las concentraciones de  $\text{Hg}^{2+}$  en sedimentos. Esto sugiere que la polución con metales pesados puede inducir la resistencia microbiana a los antibióticos por selección indirecta (McArthur y Tuckfield., 2000).

Los mecanismos de resistencia cruzada han sido estudiados y algunos autores han propuesto que la polución por metales pesados pueden causar selección indirecta de bacterias resistentes (McArthur and Tuckfield., 2000). Estas características de resistencia adquiridas, se les conoce como mecanismos de Co-selección; los cuales incluyen co-resistencia (diferentes determinantes de resistencia están presentes sobre el mismo elemento genético) y resistencia cruzada (el mismo determinante genético es responsable de la resistencia a antibióticos y metales) (Craig Baker *et al.*, 2006). Sin embargo, la relación entre exposición a mercurio y resistencia a antibióticos puede no solo depender de selección microbiana. Fuentes y Amabile-Cuevas (1997) han reportado que el mercurio puede inducir resistencia múltiple a antibióticos en *Escherichia coli* a través de la activación del sistema regulador redox SoxR.

Las propiedades de resistencia a antibióticos de una colonia bacteriana pueden ser evaluadas empleando estudios *in vitro* o a través de análisis de su contenido plásmico por hibridizaciones Southern blot (Kessie *et al.*,

1998), o análisis genómico por PCR (Marchandin *et al.*, 2001). La resistencia a mercurio puede ser determinada por crecimiento en cajas de petri que contienen mercurio o a través de la amplificación por PCR de los genes *merA*, tanto en cultivos puros como en comunidades de sedimentos (Wagner-Dobler *et al.* 2000; Von Canstein *et al.*, 2001).

Por otro lado, la contaminación ambiental por metales pesados constituye otro factor principal en la selección de bacterias clínicas o ambientales a estos agentes. Un número sustancial de reportes sugiere que la contaminación por metal podría tener un importante papel en el mantenimiento y proliferación de resistencia a antibióticos (Paniagua *et al.*, 2003; Craig Baker *et al.*, 2006). De esta manera existe la preocupación respecto al potencial de la contaminación por metales, en el mantenimiento de un conjunto de genes resistentes; tanto en ambientes naturales como clínicos.

Durante varias décadas se ha conocido que los genes de resistencia a metales y antibióticos están ligados, particularmente sobre plasmidos, porque la evidencia a la co-resistencia como un mecanismo de Co-selección metal-antibióticos viene de estudios que utilizaron transformación, digestión de plasmidos y el aprovechamiento de la secuenciación de los mismos (Novick *et al.*, 1968; Foster TJ, 1983; Nakahara *et al.*, 1977a).

Igualmente se ha reportado la aparición de cepas resistentes a metales pesados como, Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), Níquel (Ni), Plata (Ag), entre otros, dentro de un amplio rango de bacterias ambientales y clínicas tanto Gram positivas, como Gram negativas (Novick *et al.*, 1968; Groves *et al.* 1975; Porter Forbes *et al.*, 1982; Wirenam *et al.*, 1997; Otth Laura *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006).

La presencia de estos metales en altas concentraciones en el ambiente provocan efectos tóxicos sobre los organismos vivos (Aparicio *et al.*,

2005); como es el caso del mercurio que causa alteraciones neurológicas, afecciones del sistema respiratorio, reacciones de hipersensibilidad entre otras (Paniagua *et al.*, 2003).

El mercurio es un elemento existente en tres estados: mercurio elemental (Hg), sales de mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{+1}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ ) y mercurio orgánico (p.ej., metil, fenil, alquil). El mercurio elemental es un líquido de color gris plateado a temperatura ambiente y que rápidamente se vaporiza al calentarlo. Se suele denominar mercurio o azogue y se utiliza en termómetros, barómetros, baterías e instrumentos eléctricos. Entre las sales de mercurio ( $\text{Hg}^{+1}$ ), la más conocida es el cloruro mercurioso o calomelano, que se utiliza en polvos dentales, polvo para pañales y pomadas, así como en otras medicaciones. Las sales de mercurio ( $\text{Hg}^{+2}$ ) inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico, y se encuentran en pesticidas, desinfectantes, antisépticos, pigmentos, pilas secas y explosivos. Los compuestos de mercurio orgánico se utilizan en diuréticos, antisépticos, insecticidas, pesticidas, así como en la elaboración de maderas, plásticos y papel (González *et al.*, 2001).

Sin embargo los compuestos que contienen mercurio como son cloruro de mercurio, metilmercurio, fenilmercurio, merbromina (mercurocromo), y timerosal (Mertiolate) fueron usados en hospitales a mediados de 1970s en el Reino Unido, Estados Unidos, Alemania, y Japón, y más tarde en otros países (Porter Forbes *et al.*, 1982). Actualmente muchos derivados mercuriales son utilizados como preservativos en vacunas (Timerosal), en productos para el cuidado de la salud, en amalgamas dentales, como antisépticos (mercurocromo), y en aplicaciones tópicas para inhibir el crecimiento de bacterias en ambientes hospitalarios (Zambrano., 2004).

Se ha encontrado que el uso de estos compuestos órganomercuriales promueve la resistencia de muchos tipos bacterianos al mercurio (Poiate *et al.*, 2000).

Por otra parte tenemos que, el mecanismo de resistencia bacteriana a mercurio implica la reducción desde las formas más tóxicas ( $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{CH}_3\text{-Hg}$ ) hasta mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ), y está codificado por el *operon Mer*, el cual es un eficiente mecanismo de resistencia que es expresado, tanto en microorganismos Gram positivos como Gram negativos (Summers A. O., 1986; Osborn *et al.*, 1997).

Este operon puede variar en estructura y se ha establecido un modelo general de operon que contiene tres o cuatro genes estructurales llamados *merA*, *merT*, *merP*, *merC* o *merB* y dos genes reguladores *merR* y *merD*. Los genes *merT*, *merP* y *merC* codifican para proteínas transmembrana de transporte de  $\text{Hg}^{2+}$ . *MerR*, *merD* codifican para una proteína reguladora de represión *trans*. La expresión del operon es netamente inducible y depende de la presencia de  $\text{Hg}^{2+}$ , el inductor. El producto del gen *merA* es la enzima intracelular mercurio reductasa; el producto del gen *merB* son liasas organomercuriales que en combinación con *merA* son requeridas para mediar la resistencia a muchos organomercuriales tales como metilmercurio y fenilmercurio (Osborn *et al.*, 1997). La mercurio reductasa reduce  $\text{Hg}^{2+}$ , hasta  $\text{Hg}^0$  (mercurio gaseoso inerte) en la presencia de NADPH y un compuesto sulfhídrico. Es así como el  $\text{Hg}^0$  es entonces liberado dentro del citoplasma y volatilizado por la célula debido a la alta presión de vapor (Misra, 1992; Saha *et al.*, 2006). (Ver Capítulo 2)

En base a todo lo expuesto y teniendo en cuenta las estadísticas citadas anteriormente, que corresponden a datos epidemiológicos de otros países; nos encontramos que Colombia no es un país ajeno a toda esta problemática de Co-resistencia bacteriana (Hg-Antibiótico). En un estudio hecho en la bahía de Cartagena por Aparicio y colaboradores en el año

2005, se reportó la alta prevalencia de bacterias ambientales resistentes a antibióticos y compuestos mercuriales (Aparicio *et al.*, 2005).

Este hecho sumado a la falta de reportes que permitan conocer la situación actual en otras zonas del país, lleva al grupo de investigaciones microbiológicas de la facultad de medicina de la universidad de Cartagena, a plantear la realización de una investigación encaminada a la determinación de patrones de resistencia bacteriana a compuestos mercuriales y antibióticos en aislados clínicos.

Es así, que durante el desarrollo de la pasantía estuvimos vinculados de tiempo completo y dedicación exclusiva a la ejecución de la primera etapa de esta investigación.

No obstante el participar durante doce meses dentro del grupo de investigación, no solo permitió alcanzar los objetivos propuestos al inicio de la pasantía, si no que además brindo las bases requeridas para la generación, desarrollo y ejecución de una investigación científica.

En este sentido la participación en cada uno de los experimentos llevados a cabo en la línea de Microbiología nos permitió analizar e interpretar críticamente los resultados obtenidos así como participar en la búsqueda de soluciones a los problemas que se presentan durante la realización de un experimento.

De esta manera la metodología aplicada en esta primera etapa de la investigación y los resultados obtenidos de la misma son discutidos y divulgados en este capítulo.

## METODOLOGÍA

### RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Veintiséis cepas fueron escogidas de forma aleatoria y recuperadas de diferentes servicios hospitalarios, cuyo aislamiento e identificación fenotípica fue realizada utilizando el sistema automatizado de identificación bacteriana DADE BEHRING MicroScan AutoScan 4. (ROCHEN BIO CARE, Colombia S.A), de la Clínica Henríquez de la Vega, Laboratorio Clínico Sección de Microbiología en la Ciudad de Cartagena, Colombia.

### DETERMINACIÓN DE PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

Los datos de susceptibilidad antimicrobiana de todas las cepas fueron suministrados por el laboratorio clínico de la unidad hospitalaria de acuerdo al sistema de identificación mencionado anteriormente.

Del gran pool de antibióticos se seleccionaron un grupo para cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) tales como Ampicilina (**Am**). Trimetoprim/sulfametoxazol (**T/S**). Tetraciclina (**Te**). Ciprofloxacina (**Cp**). Gentamicina (**Gm**). Cefepima (**Cpe**). Imipenem (**Imp**). Cefotaxima (**Cft**).

Los antibióticos, Clindamicina (**Cln**). Eritromicina (**E**). y Vancomicina (**Vn**). Fueron seleccionados sólo para las cepas Gram positivas aisladas.

### RECOLECCION Y TRANSPORTE DE LAS CEPAS.

Las cepas seleccionadas fueron transportadas en tubos con agar caso (MERCK N° 105458) inclinado. Con sus respectivos datos, referentes al origen de la muestra, procedencia y antibiograma (Ver anexo). Las cepas

fueron almacenadas e inmediatamente transportadas en neveras de icopor a temperatura ambiente hasta los laboratorios de investigación de Microbiología de la Universidad de Cartagena.

## **ANÁLISIS DE VIABILIDAD DE LAS CEPAS**

Cada una de las bacterias recuperadas fueron inoculadas en caldo de preenriquecimiento Tioglicolato (Nº 1.08190 MERCK) e incubadas (24 horas, 37°C). Luego sembradas en placas con agar nutritivo (MERCK Nº 1.05450.0500), para verificar los aislamientos y descartar contaminación con otras bacterias.

Posteriormente fueron reconfirmadas por siembra en medios selectivos (EMB, agar Pseudomonas, manitol), e identificados fenotípicamente empleando baterías de pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, Citrato, urea, oxidasa), y además confirmando los resultados presuntivos mediante Kits BBL Cristal.

Finalmente, una vez obtenido el cultivo puro se seleccionaban colonias típicas las cuales eran sembradas en viales con agar caso (MERCK Nº 105458), e incubadas a 37°C por 24 horas, luego refrigeradas a 4°C para su conservación y utilización en posteriores ensayos (Aparicio *et al.*, 2005).

## **DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA BACTERIANA A COMPUESTOS MERCURIALES.**

Para el estudio de la resistencia bacteriana a derivados de mercurio, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó por el método de dilución en placa en agar nutritivo de acuerdo a lo reportado por Nakahara (1977); Cervantes Vega (1987); Vaca (1995). Para lo cual cada una de las cepas bacterianas aisladas e identificadas fueron sometidas a

preincubación en viales con 5mL de caldo Tioglicolato (N° 1.08190 MERCK), mas 1mg/L de un compuesto mercurial; cloruro de mercurio (CARLO HERBA), cloruro de metilmercurio (ALDRICH), mercurocromo (HIMMBETH) y mertiolate (GARBIDE & CARBON CHEMICALS) respectivamente.

Cada compuesto fue adicionado y ensayado en forma individual e incubado a 37°C por 24 horas en un agitador serológico (180 rpm). El cultivo obtenido, fue comparado al tubo número 5 en la escala McFarland correspondiente a la concentración  $15 \times 10^8$  UFC/mL; de está suspensión fueron tomados y transferidos  $50 \mu\text{L}$  a placas de agar nutritivo adicionado con las diferentes concentraciones del derivado mercurial con el cual fue preincubado; luego fueron realizadas siembras masivas por triplicado de las diferentes concentraciones del compuesto mercurial, incubándose a 37°C por 24 horas para observar crecimiento bacteriano (Aparicio *et al.*, 2005).

Las concentraciones utilizadas para los compuestos mercuriales, mertiolate (timerosal) y cloruro de metilmercurio fueron: 0, 1, 2, 3, 5, 7.5, 10, 15, 25, 35 y 50 mg/L. Para el derivado cloruro de mercurio las concentraciones fueron: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 mg/L y para el mercurocromo se adicionaron las concentraciones 500, 1000 y 3000 mg/L.

Las diluciones de los compuestos mercuriales también fueron evaluadas para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Hg resistente), así como para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (Hg sensible), utilizadas como controles positivo y negativo respectivamente (Österblad *et al.*, 1995).

La CMI se determinó como la concentración mas baja del compuesto mercurial que inhibe crecimiento bacteriano visible después de incubación

de 24 horas a 37°C Nakahara (1977); Cervantes Vega (1987); Vaca (1995).

Los criterios de resistencia a mercurio están en base a la distribución de frecuencia de la CMI de cada compuesto evaluado (Cervantes-Vega *et al.*, 1987; Vaca *et al.*, 1995).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se recuperaron 26 cepas procedentes de diferentes servicios de la Clínica Henrique de la Vega, Cartagena Colombia. Los géneros involucrados fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El 50% de las muestras fueron aisladas de urocultivos, 31% de secreciones (vaginales, oído, pie, etc.), 11% de hemocultivos y 8% de otras infecciones (Tabla 1.)

**Tabla 1.** Procedencia de las muestras aisladas de los diferentes servicios hospitalarios.

TIPO DE MUESTRA (%) <sup>*</sup>	SERVICIO		MICROORGANISMO AISLADO (%)
	HOSPITALARIO (%) **		
	CONSULTA EXTERNA	PISO	
Urocultivo (50)	(92)		<i>E. coli</i> (75) <i>K. pneumoniae</i> (25)
	(8)		<i>E. coli</i> (100)
Secreciones (31)	(50)		<i>E. coli</i> (25) <i>P. aeruginosa</i> (50) <i>S. aureus</i> (25)
	(50)		<i>E. coli</i> (25) <i>K. pneumoniae</i> (50) <i>S. aureus</i> (25)
Hemocultivo (11)	Ninguno		Ninguno
	(100)		<i>K. pneumoniae</i> (30) <i>S. aureus</i> (70)
Otros (8)	(50)		<i>E. coli</i> Ulcera
	(50)		<i>P. aeruginosa</i> Espudo

\* Porcentaje en función del número total de cepas.

\*\* Porcentaje en función al tipo de muestra.

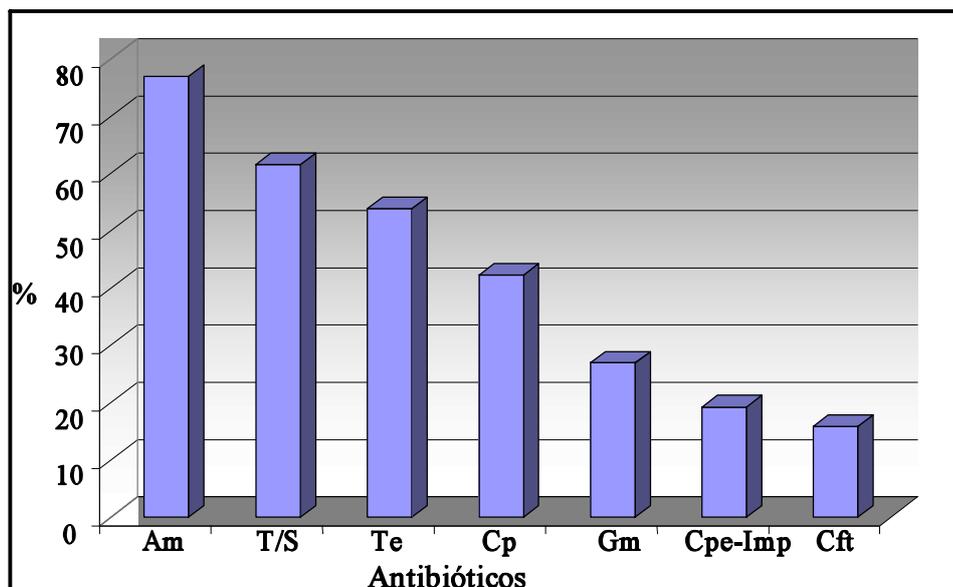
El 92% de los urocultivos provenían de consulta externa encontrándose *Escherichia coli* en un 75% como el principal microorganismo aislado; mientras que las secreciones se obtuvieron en un 50% de pacientes

internados y el restante de pacientes ambulatorios (consulta externa) de las cuales se aislaron cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (50% respectivamente). En hemocultivos *Staphylococcus aureus* (70%) ocupó el primer lugar como aislamiento en sangre o causante de bacteriemias.

## PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

De las 26 cepas aisladas de los diferentes servicios hospitalarios, cerca del 76.92% fueron resistentes al antibiótico  $\beta$ -lactámico ampicilina (*Fig 1*), 61.53% al trimetoprim/sulfametoxazol y 53.84% a la tetraciclina. El 42.3% de las cepas mostró resistencia a la ciprofloxacina y el 26.92% a la gentamicina. Los porcentajes mas bajos de resistencia fueron para los antibióticos cefepima e imipenen con un 19.23% respectivamente y para la cefotaxima con un 15.83%.

Para los antibióticos usados en las cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), de las cuatro cepas dos mostraron resistencia al antibiótico Eritromicina, mientras que para Clindamicina y Vancomicina se reportó una sola cepa resistente respectivamente.



**Figura 1.** Resistencia antibióticos de cepas Gram (+/-) aisladas de diferentes servicios de la Clínica Henrique de la Vega.

**Am**=ampicilina. **T/S**=trimetoprim/sulfametoxazol. **Te**= tetraciclina. **Cp**= ciprofloxacina. **Gm**= gentamicina. **Cpe**= cefepima. **Imp**= imipenem. **Cft**= cefotaxima.

El valor relativamente alto de resistencia a la ampicilina (76.92%), reportada en nuestro trabajo es comparable a diversos autores que muestran alta resistencia a este antibiótico, como es el caso de un trabajo de multiresistencia a antibióticos y metales pesados realizado con cepas de *Staphylococcus aureus* reportando resistencia hasta del 94 % para este antibiótico (Paniagua *et al.*, 2003). Así mismo Karbasizaed en un estudio de infecciones nosocomiales en un hospital Iraquí, reportó que el 100% de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* fueron resistentes a la ampicilina y mercurio (Karbasizaed *et al.*, 2003).

Por otra parte en nuestro trabajo encontramos que el 61.53% (*Fig 1.*) de las cepas fueron resistentes también al trimetoprim/sulfametoxazol, datos que son similares a lo reportado por Karbasizaed en cepas de *Escherichia coli* (73.3%). Aunque estos datos son diferentes a los obtenidos por Atencio-Bracho (2005) en los cuales el 100% de sus muestras eran susceptibles a este mismo antibiótico.

Referente a los datos de resistencia a los antibióticos tetraciclina y gentamicina los porcentajes fueron 53.84% y 26.92% respectivamente, similares a los presentados por varios autores (Karbasizaed *et al.*; 2003, Paniagua *et al.*; 2003). Aún cuando estos resultados contrastan notablemente con los reportados por Atencio-Bracho (2005) que obtuvo un porcentaje de (9.52%) para la tetraciclina y (4.76%) para gentamicina en cepas de *Staphylococcus aureus*.

La presencia de resistencias intermedias al antibiótico ciprofloxacina (42.3%), es aproximado al 62.5% reportado por Narváez (2005), en cepas de *E. coli*. Al igual que Chumpitaz-conde (2001) con porcentajes similares de (64%) para este mismo antibiótico.

Los porcentajes mas bajo de resistencia fueron para los antibióticos cefepima e imipenen con 19.23% cada uno y para cefotaxima con un

(15.83%). Estos datos son similares a los reportados en el estudio hecho por Chumpitaz (2001), el cual muestra bajos porcentajes de resistencia a cefepima (15.44%) y cefotaxima (18.00%), pero difiere ampliamente respecto al antibiótico imipenen, quien reporta una resistencia muy baja (2.73%).

Diversos autores afirman que el antibiótico imipenen es el más efectivo en el tratamiento de infecciones bacterianas, como es el caso de Jaramillo (1996), en un estudio realizado en la unidad de cuidados intensivos de un hospital de la ciudad de Caldas, Colombia en el periodo 1992 – 1994, quien encontró cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con porcentajes de cero resistencia a este antibiótico.

Recientemente Miranda (2006), reportó cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con porcentajes de resistencia que oscilan entre (0 – 1%), para este mismo antibiótico en las unidades de cuidado intensivo de varios hospitales en Colombia entre los años 2003, 2004 y 2005.

Finalmente en este estudio podemos apreciar que cerca de un 80% de las cepas evaluadas presentaron resistencia a dos o más antibióticos. El mayor porcentaje de multiresistencia correspondió a tres antibióticos (34.78%), seguido de cuatro (17.39%), y dos (13.04%) antibióticos. Los más bajos porcentajes fueron para siete (8.69%), cinco, seis y ocho (4.34%) antibióticos respectivamente. Estos resultados evidencian un fenotipo de multiresistencia en las cepas seleccionadas, lo que demuestra la importancia de aislar el agente patógeno en las infecciones para aplicar la prueba de susceptibilidad a los antibióticos, a fin de administrar el antimicrobiano más eficaz.

## CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DE COMPUESTOS MERCURIALES.

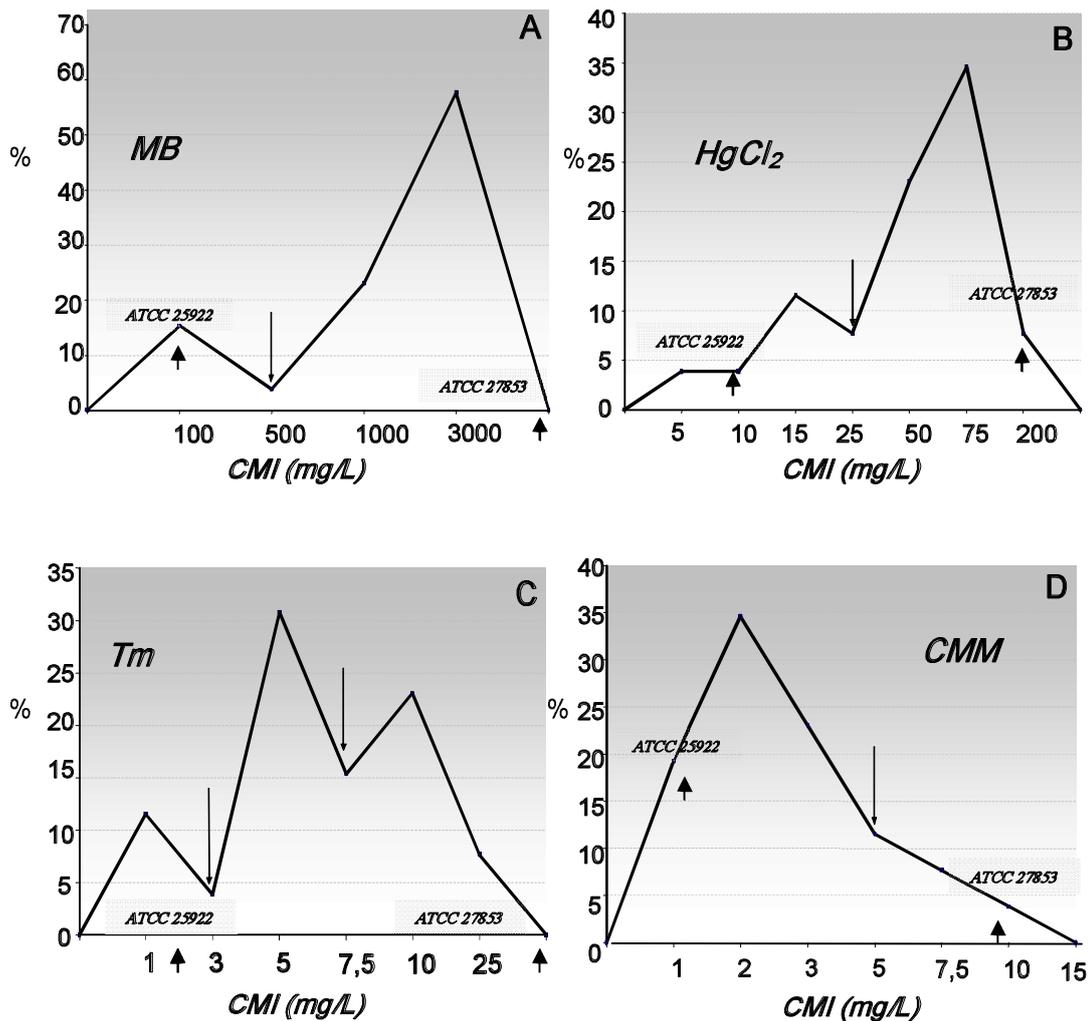
La distribución de la CMI de los compuestos mercuriales es mostrada en la *Figura 2*. Los valores para considerar las cepas clínicas como sensibles o resistentes fueron obtenidos de las distribuciones de frecuencia de las CMI. Las curvas bimodales de HgCl<sub>2</sub> y mercurocromo (MB) (*Fig 2A, 2B*), permiten una clara distinción entre las cepas sensibles y resistentes; con 73.06% de las cepas resistentes para HgCl<sub>2</sub> (CMI ≥ 25 mg/L) y un 84.61% para MB (CMI =500 mg/L). La resistencia encontrada a HgCl<sub>2</sub> y MB es semejante a la reportada por Cervantes y colaboradores en un estudio realizado en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. (Cervantes-Vega *et al.*, 1987); igualmente Paniagua en el 2003 reporto un 100% de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a HgCl<sub>2</sub> (CMI= 20-40 mg/L) (Paniagua *et al.*, 2003).

Respecto al cloruro de metilmercurio (CMM), observamos que la distribución de la CMI se mantuvo en un solo pico de sensibilidad (CMI=1 –5 mg/L); sin embargo se observa un pequeño grupo (17%) de aislamientos resistentes, lo que indica el alto grado de toxicidad para los sistemas biológicos (CMI ≥ 5mg/L). (*Fig 2D*).

En el caso del timerosal (Tm) (*Fig 2C*), unos tres patrones de distribución aparecen, incluyendo una población moderadamente resistente (CMI=3 – 5mg/L) y un grupo altamente resistente (CMI ≥ 7.5mg/L). Este tipo de patrón de distribución para el timerosal también fue reportado en una colección de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. (Saha *et al.*, 2006); y es probable que sea el resultado de la funcionalidad de altos y bajos niveles de mecanismos de resistencia. (Silver y Walderhaugh. 1992).

Por ultimo la aparición de resistencia a derivados mercuriales en bacterias clínicas podría ser explicada por tres alternativas (Robinson y

Tuovinen, 1984), (I) selección por el uso de derivados mercuriales en clínicas y hospitales (Nakahara *et al.*, 1977a; Porter *et al.*, 1982; Poiata *et al.*, 2000), (II) selección por contaminación mercurial extrahospitalaria (Hall, 1970; Khesin y Karasyova, 1984; Provash Chandras *et al.*, 1997), y (III) selección indirecta por asociación de resistencia a mercurio y resistencia a antibiótico sobre plásmidos (Hall, 1970; Groves y Young, 1975; Goldmann y Huskins, 1997; Craig Baker *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Curvas de distribución de concentraciones mínima inhibitoria (CMI) de los aislados clínicos. A – Mercurocromo (MB); B – HgCl<sub>2</sub>; C – Timerosal (Tm); D – Cloruro de metilmercurio (CMM). La flecha indica la concentración por encima de la cual los aislamientos son considerados como resistentes.

*Escherichia coli* ATCC 25922 (Hg sensible); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Hg resistente). (↑) Indica la CMI de la cepa control.

## **PATRONES DE MULTIRESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y COMPUESTOS MERCURIALES.**

La tabla No. 2 muestra el número de patrones de multiresistencia a los derivados mercuriales probados, el número de cepas por cada uno de ellos y los patrones de resistencia a antibióticos.

Se observaron un total de 8 patrones distintos de multiresistencia a derivados mercuriales, dentro de los cuales 2 estuvieron representados por 6 cepas cada uno, 3 patrones por 2 cepas y un solo patrón por 5 cepas. El patrón de resistencia Hg<sup>+2</sup>, MB, Tm, CMM fue el que presentó mayor variabilidad respecto a la multiresistencia a antibióticos.

Es importante mencionar que 5 patrones de multiresistencia representados por 21 cepas, comparten en común la resistencia Ampicilina, Trimetoprim/sulfametoxazol, Tetraciclina, así, como a HgCl<sub>2</sub> y mercurocromo. Estos resultados son muy similares a los reportados por otros autores (Österblad *et al.*, 1995; Paniagua *et al.*, 2003) quienes encontraron una alta co-resistencia Hg-antibióticos en una colección de aislados clínicos.

**Tabla 2.** Patrones de resistencia a antibióticos y compuestos mercuriales en los aislados clínicos.

Patrón de resistencia a Hg	Patrón de resistencia a antibióticos	Nº de cepas	Microorganismo
Hg <sup>+2</sup>	Am Te Cp Gm Imp Cpe Cft Am T/S Te	2	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
Hg <sup>+2</sup> , MB	Am Te Cp Gm Imp Cpe Cft Am T/S Te Cp Gm Imp Cpe Am T/S Te Am T/S Cp Am T/S	6	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i>
Hg <sup>+2</sup> , MB, Tm	Am T/S Te Am T/S Imp Am T/S Te Cp Am T/S Te Cp Gm Cpe Cft	6	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i>
Hg <sup>+2</sup> , MB Tm, CMM	Am T/S Cp Gm Cpe Am T/S Cp Am T/S Te Am Imp	5	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. pneumoniae</i>
Hg <sup>+2</sup> , MB CMM	Am T/S CP	1	<i>E. coli</i>
Hg <sup>+2</sup> Tm	Te Cp	1	<i>E. coli</i>
MB	Am T/S Cp Gm Am T/S Te Gm	2	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i>
MB Tm		2	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
		25 <sup>a</sup>	

a: número total de cepas diferentes resistentes a compuestos mercuriales.

Hg<sup>+2</sup>=HgCl<sub>2</sub>. MB=Mercurocromo. Tm=Timerosal (Mertiolate). CMM=cloruro de metilmercurio. Am= Ampicilina. T/S=Trimetoprim/sulfametoxazol. Te=Tetraciclina; Cp= Ciprofloxacina. Gm= Gentamicina. Cpe= Cefepima. Imp= Imipenem. Cft= Cefotaxima.

Casi todos los patrones de resistencia incluyeron a los antibióticos Am, T/S, Te, Cp, Gm, así como los compuestos HgCl<sub>2</sub>, MB, Tm. Con estos datos podemos sugerir que algunos de los patrones de multiresistencia presentes en las cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* podrían estar conferidos por plásmidos. De este modo, si los genes que confieren la resistencia a los cinco antibióticos y tres compuestos mercuriales antes mencionados, se encuentran ligados en el mismo plásmido, la administración de un solo antibiótico conducirá, de manera indirecta, a la selección de cepas resistentes a los otros cuatro antibióticos y a los tres compuestos.

De esta manera si existe un excesivo e indiscriminado uso de los antibióticos, para consumo humano, veterinario y agrícola, podrían actuar como principal factor para la selección de bacterias resistentes a estos compuestos químicos; pero, caso contrario ocurre, cuando una elevada contaminación ambiental por metales pesados podría favorecer la selección de cepas resistentes a antibióticos, debido a que los genes responsables de estas resistencias se encuentran en el mismo plásmido.

De tal manera que la elevada resistencia a derivados mercuriales que presentan las cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* reportadas en este estudio, refleja de una u otra manera la alta contaminación ambiental por estos compuestos, corroborando lo propuesto por Aparicio y colaboradores, (2005), quien describe que un amplio grupo de bacterias Gram negativas aisladas de la bahía de Cartagena presentan niveles variables de resistencia a antibióticos y mercurio.

De otra parte, diferentes investigaciones han demostrado que los determinantes de resistencia a mercurio varían en el número de genes involucrados y están codificados por el operon *mer*, normalmente localizado sobre plasmidos (Summers y Silver., 1972; Brown *et al.*, 1986; Griffin *et al.*, 1987; Radstrom *et al.*, 1994) y cromosomas (Wang *et al.*, 1987; Inoue *et al.*, 1991). Para Summers *et al.*, (1993) la resistencia a mercurio es común en bacterias orales por la presencia de amalgamas dentales, y a su vez en bacterias residentes en otros sitios del cuerpo. Österblad *et al.*, (1995) y Edlund *et al.*, (1996) han indicado la prevalencia de bacterias Gram negativas resistentes a estas sustancias (mercurio-antibióticos) aisladas de heces de diversos individuos. Para Jorgensen y Slots, (2000), el uso de antibióticos como tratamiento para infecciones orales (periodontitis, abscesos) contribuyen a este fenómeno de resistencia. Es así como la resistencia a mercurio ha sido asociada con los antibióticos como lo reporta Davis *et al.*, (2005) al estudiar cepas de

*Enterococcus faecium* aislada en la cavidad oral de un mono cynomolgus, resistente a mercurio, tetraciclina y estreptomicina, indicando que los genes de resistencia a mercurio como estreptomicina están genéticamente unidos. Pike *et al.*, (2002), observaron una considerable resistencia a diferentes antibióticos y mercurio, en bacterias como *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp* *Pseudomonas spp*.

Este estudio constituye una investigación preliminar en la ciudad de Cartagena, Colombia, en búsqueda de patógenos clínicos asociados a la resistencia frente a metales pesados. Mostrando datos epidemiológicos que permitan analizar el impacto de la contaminación ambiental asociada al uso de derivados mercuriales, que promuevan la resistencia a diferentes grupos de antibióticos. Por lo tanto, con el fin de profundizar es necesario realizar estudios de biología molecular para la caracterización de las cepas con el fin de determinar la presencia o ausencia de determinantes *mer* que confiere resistencia frente a compuestos mercuriales.

Por ultimo, al observar este comportamiento de respuesta bacteriana estudiada por tantos años, nos indica que la presencia de esta respuesta no sería algo extraño en nuestro medio y que por lo tanto deben crearse estrategias de control, tratamiento y prevención efectivas, tanto en áreas de la salud como ambientales.

## CONCLUSIONES

- ✓ La resistencia a los antimicrobianos fue variable, las bacterias en su mayoría fueron resistentes a ampicilina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol. Contrario a esto sensibles a cefepima imipenem y cefotaxima.
- ✓ Dentro de la población bacteriana estudiada se encontró una resistencia importante a compuestos de mercurio inorgánico ( $\text{HgCl}_2$ ) y órganomercuriales (MB, Tm y CMM), siendo para este ultimo la resistencia mas baja.
- ✓ Se encontraron siete patrones distintos de resistencia a antibióticos distribuidos en ocho patrones diferentes de resistencia a mercurio. indicando una considerable relación de co-resistencia antibiótico – mercurio, lo cual podría sugerir la presencia de genes de resistencia.
- ✓ Los resultados obtenidos permiten suponer que la aparición de patrones de resistencia a antibióticos y compuestos mercuriales, difieren ampliamente, quizás como respuesta a la presión selectiva a la cual podrían estar sometidas estas bacterias por el amplio uso de antibióticos y contaminación ambiental por metales pesados.
- ✓ Estos resultados son sugerentes para realizar estudios a nivel molecular para el establecimiento de mecanismos de co-resistencia a antibióticos y mercurio.
- ✓ Los datos encontrados podrían sugerir que las bacterias aisladas de ambientes clínicos podrían utilizarse como indicadores para evaluar la contaminación ambiental por metales pesados en nuestro medio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo O Shittu and Johnson Lin. (2006). Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infectious Diseases*, **6**:125
- Atencio-Bracho L., Álvarez-González M., Guíñez-Ortega J., Montiel X., Salas-Bracho M. (2005). *Staphylococcus aureus*: sensibilidad a antibióticos, metales pesados y patrón plasmídico. *Ciencia*. **13** (1): 5-13.
- Aparicio Dilia. (2005). Caracterización de la flora bacteriana marina resistente a derivados mercuriales presentes en el sedimento de la bahía de Cartagena. Colombia. *Universidad de Cartagena. Maestría de Microbiología*.
- Bhattacharya, M., Choudhury, P., y Kumar R. (2000). Antibiotic- and metal-resistant strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimps. *Microb. Drug Resist.* **6**(2):171-172.
- Boon, P.I., y Cattanach, M. (1999). Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**(3):164-168.
- Brown N. L., Misra T. K., Winne J. N., Schmidt A., Seiff M. and Silver S. (1986). The nucleotide sequence of the mercury resistance operons of plasmid R 100 and transposon Tn501: further evidence for *mer* genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen. Genet.* **202**:143-151.
- Cervantes-Vega C & Chávez Jaime. (1987). Susceptibility to mercurials of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. **53**:253-259.
- Chumpitaz-Conde J E., Medina-Flores J., Ana Huamán., Cigüeña- Sieden S., Sara Palomino. (2001). resistencia bacteriana en infecciones intrahospitalarias de vías urinarias. *Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*. 1. (4).
- Dahlberg, C., C. Linberg, V. L. Torsvik, y Hermansson, M. (1997). Mercury resistance plasmids isolated from bacteria in marine environments are highly variable and show no homology to probes used for replicon typing. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4692-4697.
- Dahlberg C., Bergström M., y Hermansson M. (1998). In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacteria communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(7):2670-75.

- Davis I., Roberts A., Ready D., Richards H., Wilson M. y Mullany P. (2005). Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance of a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. *Plasmid*. **54**: 26-38.
- Edlund C., Bjorkman L., Ekstrand j., Sandborg-Englund G. y Nord E. (1996). Resistance of the normal human microflora to mercury and antimicrobials after exposure to mercury fore dental amalgam fillings. *Clin Infect Dis*. **22**: 944-950.
- Erb A., T. Stürmer., R. Marre. & H. Brenner A. (2007). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **26**:83–90.
- Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M., y Blaghen, M. (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr. Microbiol*. **41**(3):151-156.
- Firth Neville *et al.* (2000). Replication of staphylococcal multiresistance plasmids. *Journal of Bacteriology*. **182**: 2170-2178.
- Foster T.J. (1983). Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**: 361–409.
- Fuentes, A.M., y Amabile-Cuevas, C.F. (1997). Mercury induces multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli* through activation of SoxR, a redox-sensing regulatory protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**(2):385-388.
- Goldmann D A & Huskins W C. (1997). Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. *Clin Infect Dis*. **24**. (1): S 139-45.
- González Ramiro., Rodolfo Alfonso., Botero Martha. (2001). Púrpura de henoch-schönlein secundaria a hipersensibilidad por mercurio en un preescolar. A propósito de un caso. *Archivos venezolanos de puericultura y pediatría*. **64**. (3): 156-162.
- Griffin H. G., Foster T. J., Misra T. K and Silver S. (1987). Cloning and DNA sequence of the mercuric–and organomercurials-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc. Natl. Acad. USA*. **84**:3112-3116.
- Groves J David and Frank E. Young. (1975). Epidemiology of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria: Resistance Patterns in Staphylococci Isolated from Populations Not Known to be exposed to Heavy Metals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **7** (5): 614-621.
- Hall B. M. (1970). Mercury resistance of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hygiene* **68**:121-129.

- Inoue C., Sugawara K. and kusano T. (1991). The *merR* regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from the *mer* structural genes. *Mol. Microbiol.* **5**: 2707-2728.
- Jaramillo Eduardo León. (1996). Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994. *Colombia Med.* **27**: 69-76.
- Jorgensen M. y Slots J. (2000). Rensible use of antimicrobials in periodontics. *J. Cal. Assoc.* **28**: 185-193.
- Karbasizaed Vajiheh., Badami Naser., Emtiazi Giti. (2003). Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *African Journal of Biotechnology.* **2** (10): 379-383.
- Kessie, G., Ettayebi, M., Haddad, A.M., Shibl, A.M., al-Shammary, F.J., Tawfik, A.F., y al-Ahdal, M.N. (1998). Plasmid profile and antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from polluted water. *J. Appl. Microbiol.* **84**(3):417-422.
- Khesin, R. B. & E. V. Karasyova. (1984). Mercury-resistant plasmids in bacteria from a mercury and antimony deposit area. *Mol. Gen. Genet.* **197**:280-285.
- Livermore, D.M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases.* **36** (Suppl. 1), S11–S23.
- Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Jumas-Bilak, E., Isson, L., Drouillard, B., Darbas, H., y Carriere, C. (2001). Distribution of macrolide resistance genes *erm*(B) and *mef*(A) among 160 penicillin-intermediate clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated in southern France. *Pathol Biol (Paris).* **49**(7):522-527.
- McArthur, J.V., y Tuckfield, R.C. (2000). Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(9):3722-3726.
- Miranda M. C., Pérez F., Zuluaga T., Olivera M. del Rosario., Correa A., Reyes S L., Villegas M V. y Grupo de Resistencia Bacteriana Nosocomial de Colombia. (2006). Resistencia a antimicrobianos de bacilos Gram negativos aislados en unidades de cuidado intensivo en hospitales de Colombia, WHONET 2003, 2004 y 2005. *Bioméica.* **26**. 424-33.
- Misra T K. (1992). Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid.* **27** (1): 4-16.
- Miranda, C.D., y Castillo, G. (1998). Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *Sci. Total Environ.* **224**(1-3):167-176.

- Nakahara H., Ishikawa T., Sarai Y., Kondo I., Kozukue H and Mitsuhashi S. (1977a). Mercury Resistance and R Plasmids in *Escherichia coli* Isolated from Clinical Lesions in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **11** (6): 999-1003.
- Nakahara H., Ishikawa T., Sarai Y., Kondo I., Kozukue H and Silver S. (1977b). Linkage of Mercury, Cadmium, and Arsenate and Drug Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*. **33** (4): 975-976.
- Narváez E., Álvarez M., Guíñez J y Atencio L. (2005). Susceptibilidad a antibióticos y metales pesados y perfil plasmídico en *Escherichia coli*. *Bol. Centro Invest. Biol.* **39**. (1): 55–66.
- Nascimento A., C. campos., E. campos, J. Azevedo y E. Chartone Souza. (1999). Re-evaluation of antibiotic and mercury resistance in *Escherichia coli* populations isolates in 1978 from Amazonian rubber tree Tappers and Indians. *Res. Microbiol.* **150**(6): 407-411.
- Novick R.P and Roth, C. (1968). Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. **95**: 1335–1342.
- Osborn M., Bruce K D., Strike P. and Ritchie D A. (1997). Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS microbiol. Rev.* **19**: 239-262.
- Otth Laura., Solis G., Wilson M., Fernández H. (2005). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* to heavy metals. *Brazilian Journal of Microbiology*. **36**:286-288
- Paniagua Contreras G. L., Monroy Pérez E., Vaca Pacheco S., González Almazán S. E. (2003). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Médica del Hospital General de México*. **66** (1):13 – 21.
- Pike R., Lucas P., Stapleton S., Gilthorpe G., Rowbury R., Richards H., Mullany P. y Wilson M. (2002). Prevalence and antibiotic resistance profiles mercury-resistant oral bacterial from children with and without mercury amalgam fillings. *Journal. Antim. Chem.* **49**: 777-783.
- Poiata A., Badicut I., Indres M., Biro M., Buiuc D. (2000). Mercury resistance among clinical isolates of *Escherichia coli*. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* **59** (1-2): 71-9.
- Porter Forbes D., Silver S., Ong K. and Nakahara H. (1982). Selection for Mercurial Resistance in Hospital Settings. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **22** (5): 852-858.
- Radstrom P., Skold O., Swedberg G., Fensburg J., Roy P. H. and Sundstrom L. (1994). Transposon Tn5090 of the plasmid R751, which carries integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *Journal of Bacteriology*. **176**: 3257-3268.

- Rasmussen, L.D., y Sorensen, S.J. (1998). The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. *Curr. Microbiol.* **36**(5): 291-297.
  
- Robinson J B. & O. H. Tuovinen. (1984). Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercurials compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiological Reviews.* **48**: 95-124.
  
- Restrepo Ángela., Robledo Jaime y Robledo Carlos. (2003). Resistencia bacteriana a antibióticos. Fundamentos de Medicina Interna. Enfermedades Infecciosas. 6<sup>ed</sup>.pp. 38-42.
  
- Reyes Jinnethe, Hidalgo Marylin , Díaz Lorena, Rincón Sandra, Moreno Jaime, Vanegas Natasha, Castañeda Elizabeth, Arias César A. (2007), Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *International Journal of Infectious Diseases* doi:10.1016/j.ijid.2006.09.005
  
- Roane, T.M., y Kellogg, S.T. (1996). Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* **42**(6): 593-603.
  
- Rodríguez C.H., J. Juárez., C. DE Mier., L. Pugliese., G. Blanco., C. Vay., A. Famiglietti. (2003). Resistencia a antibióticos de bacilos Gram negativos aislados en unidades de cuidados intensivos análisis comparativo de dos periodos (1998-2001). *Medicina (buenos aires).* **63**: 21-27.
  
- Ryan K & Ray G. Sherris Microbiología Medica. 4<sup>ed</sup>. McGraw Hill. 2004. pp: 377-403.
  
- Saha D. K., Ghosh S., Chaudhuri J., Mandal A. (2006). Mercury resistance in bacterial strains isolated from hospital and clinics. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **77**: 88-95.
  
- Silver S & Walderhaugh M. (1992). Regulation of chromosomal and plasmid cation and anion transport systems. *Microbiol. Rev.* **56**: 1-33.
  
- Summers A O and Silver S. (1986). Mercury resistance in a plasmid – bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* **112**:1228-1236.
  
- Summers A. O. (1986). Organization, expresión and evolution of genes for mercury resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 607-634.
  
- Summers A.O., Wireman J., Murray J., Vimy F. and Lynne billard. (1993). Mercury released from dental silver fillings provokes an increase in mercury-resistant and antibiotic resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob. Agents. Chemther.* **37**: 825–834.

- Vaca Sergio., Miranda Raúl., Cervantes-Vega C. (1995). Inorganic-ion resistance for bacteria isolated from a Mexico City freeway. *Antonie van Leeuwenhoek*. **67**: 333-337.
- Verma, T., Srinath, T., Gadpayle, R.U., Ramteke, P.W., Hans, R.K., Garg, S.K. (2001). Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. *Bioresour Technol*. **78**(1): 31-35.
- Von Canstein, H.F., Li, Y., y Wagner-Döbler, I. (2001). Longterm stability of mercury reducing microbial biofilm communities analysed by 16S-23S rDNA interspacer region polymorphism. *Microbial. Ecology*. **42**:624-634.
- Wagner-Dobler, I., Lünsdorf, H., Lubbehusen, T., Von Canstein, H.F., y Li, Y. (2000). Structure and species composition of mercury-reducing biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**(10): 4559-4563.
- Wang Y., Mahler I., Levinson H. S. and Halvorson H. O. (1987). Cloning and expression In *Escherichia coli* of chromosomal mercury resistance genes from a *Bacillus sp.* *Journal of Bacteriology*. **169**:4848-4851.
- Ward Marcia M., D.J. Diekema., J.W. Yankey., T.E. Vaughn., B.J. BootsMiller., J.F. Pendergast & B.N. Doebbeling. (2005). Implementation of strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in U.S. hospitals. *Infect. Cont. and hosp. epidemiology*. **26**: 21-30.
- Wireman J., Liebert C., Smith T. and Summers Anne O. (1997). Association of Mercury Resistance with Antibiotic Resistance in the Gram-Negative Fecal Bacteria of Primates. *Applied and environmental microbiology*. **63** (11): 4494–4503.
- Yüksel Selcuk, Burcu Öztürk, Aslı Kavaz, Z. Birsin Özçakar, Banu Acar, Haluk Güriz, Derya Aysev, Mesiha Ekim, Fatos Yalcinkaya. (2006). Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and evaluation of empirical treatment in Turkish children with urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **28** 413–416
- Zambrano Betzana. (2004). Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal, y su uso en vacunas pediátricas. *Rev Med Uruguay*. Revisión. **20**:4-11.

## CAPITULO 2. *Revisión.*

### OPERON *MER*: SEÑAL DE RESISTENCIA BACTERIANA A MERCURIO

*Alfonso Bettin & Elkin Prieto.*

#### RESUMEN

El mercurio es una sustancia toxica potente, que esta presente en el ambiente como resultado de procesos naturales y de fuentes antropogénicas. La cantidad de mercurio movilizado y liberado en la biosfera ha incrementado desde los inicios de la era industrial hasta nuestros días.

Generalmente encontramos acumulaciones de mercurio en la cima de la cadena alimenticia, y es así que los organismos en el nivel trofico más alto tienen concentraciones de mercurio elevadas.

Algunas bacterias son capaces de resistir la contaminación por metales pesados a través de la transformación química por reducción, oxidación, metilación y dimetilación. Uno de los sistemas biológicos mejor entendido para la desintoxicación de compuestos inorgánicos u organometalicos involucra el operon *mer*. Los determinantes *merRTPCDAB*, en estas bacterias están localizados frecuentemente o normalmente sobre plasmidos o transposones, aunque también pueden ser encontrados en cromosomas.

Existen dos clases de resistencia a mercurio a saber una de espectro reducido y otra de resistencia específica a mercurio inorgánico, mientras que la de amplio espectro incluye resistencia a órganomercuriales, codificados por el gen *merB*. El gen regulador *merR* es transcrito de un promotor con orientación diferente a la del promotor de los otros genes

*mer. merR* regula la expresión de los genes estructurales del operon en forma positiva y negativa. La resistencia es debida a la unión y entrada de  $\text{Hg}^{+2}$  hacia la célula, donde es reducido hasta  $\text{Hg}^0$  por la enzima citoplasmática mercurio reductasa.

La expresión combinada de resistencia a los antibióticos y mercurio puede ser causada por selección, como una consecuencia del mercurio en el ambiente.

**Palabras claves:** mercurio, operon *mer*, resistencia bacteriana a mercurio.

## INTRODUCCIÓN

La presencia de metales pesados en el ambiente ha recibido gran atención debido a su alta toxicidad en la naturaleza y su translocación a través de la cadena alimenticia y los procesos de bioacumulación y biomagnificación (Robinson and Tuovinen., 1984).

El mercurio es un metal pesado distribuido ampliamente en el mundo. Es el más tóxico de los metales pesados (Gerlach., 1981) y el sexto en la lista de los compuestos más tóxicos (Nascimento and Chartone- Souza, 2003). Muchas de sus formas químicas son tóxicas para todos los sistemas biológicos (Osborn *et al.*, 1997), en especial para la salud pública como es el caso del Metilmercurio. Actualmente en el mundo hay muchas áreas contaminadas con mercurio lo cual es una amenaza para el medio ambiente y la salud de las personas (Barkay & Wagner., 2006).

El mercurio se encuentra actualmente en diversos medios y alimentos en todas partes del mundo a niveles que afectan adversamente a los seres humanos y la vida silvestre donde una de las vías de contaminación a los humanos es por el consumo de pescado contaminado (Clarkson, 1997, 2002). Este es el resultado final de los procesos de bioacumulación y biomagnificación de metil mercurio en alimentos de origen acuático.

El nivel de toxicidad en seres humanos y otros organismos varía según el tipo de derivado mercurial, cantidad del mismo, vía de exposición y vulnerabilidad de la persona expuesta. Los humanos pueden estar expuestos al mercurio de diversas vías; además del consumo de pescado, los usos ocupacionales y domésticos, las amalgamas dentales y las vacunas que contienen mercurio.

Las actividades antropogénicas (asociadas con la actividad humana), han generalizado los casos de exposición, y las prácticas del pasado han

dejado un legado de mercurio en vertederos, desechos de la minería y los emplazamientos, suelos y sedimentos industriales contaminados. Hasta las regiones donde se registran emisiones mínimas de mercurio, como el Ártico, se han visto adversamente afectadas debido al transporte transcontinental y mundial del mercurio.

La fuente más importante de contaminación con mercurio son las emisiones al aire, pero se producen también emisiones de mercurio de diversas fuentes que van directamente al agua y a la tierra. Una vez depositado, el mercurio puede cambiar de forma (principalmente por metabolismo microbiano) y convertirse en metilmercurio, que tiene la capacidad de acumularse en organismos (bioacumulación) y concentrarse en las cadenas alimentarias (biomagnificación), especialmente en la cadena alimentaria acuática (peces y mamíferos marinos entre otros). El mercurio produce diversos efectos adversos, importantes y documentados, sobre la salud humana y el medio ambiente de todo el mundo (PNUMA Productos químicos, 2005).

Esta revisión pretende mostrar un panorama global del mercurio y sus derivados, así como enfocar la resistencia bacteriana a este metal que involucra al operon *mer* y su asociación tanto con la resistencia al mercurio y sus derivados como a los antibióticos.

## **PRINCIPALES FUENTES DE LIBERACIONES DE MERCURIO**

Las fuentes principales de contaminación por mercurio pueden agruparse en cuatro categorías, a saber:

- Fuentes naturales: liberaciones debidas a la movilización natural del mercurio tal como se encuentra en la corteza terrestre, como la actividad volcánica, la erosión en las rocas y la evaporación desde los cuerpos de agua (Nriagu *et al.*, 1992);
- Las actuales liberaciones antropógenas resultantes de la movilización de impurezas de mercurio en materias primas como los combustibles fósiles en particular el carbón, y en menor medida el gas y el petróleo y otros minerales extraídos, tratados y reciclados (Fitzgerald & Clarkson., 1991);
- Las actuales liberaciones antropógenas resultantes del uso intencional del mercurio en productos y procesos durante la fabricación, los derrames, la eliminación o incineración de productos agotados y liberaciones de otro tipo (Fitzgerald & Clarkson., 1991);
- La removilización de liberaciones antropógenas pasadas de mercurio anteriormente depositado en suelos, sedimentos, masas de agua, vertederos y acumulaciones de desechos o residuos.

## QUÍMICA DEL MERCURIO

El mercurio se encuentra de manera natural en el medio ambiente y existe en una gran variedad de formas. Al igual que otros metales tales como plomo y cadmio, mercurio es un elemento constitutivo de la tierra y considerado un metal pesado. En su forma pura, se lo conoce como mercurio “elemental” o “metálico” (representado también como Hg o Hg<sup>0</sup>).

Rara vez se le encuentra en su forma pura, como metal líquido; es más común en compuestos y sales inorgánicas. El mercurio puede enlazarse con otros compuestos, en estado monovalente o divalente (representado como Hg (I) y Hg (II) o Hg<sup>+2</sup>, respectivamente). A partir del Hg (II) se

pueden formar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio (PNUMA Productos químicos, 2005).

El mercurio elemental es un metal blanco plateado brillante, en estado líquido a temperatura ambiente. Normalmente se utiliza en termómetros y en algunos interruptores eléctricos. A temperatura ambiente, y si no está encapsulado, el mercurio metálico se evapora parcialmente, formando vapores de mercurio incoloros e inodoros.

Algunos de los compuestos inorgánicos de mercurio son sulfuro de mercurio ( $\text{HgS}$ ), óxido de mercurio ( $\text{HgO}$ ) y cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). A estos compuestos también se les conoce como sales de mercurio. La mayoría de los compuestos inorgánicos de mercurio son polvos o cristales blancos, excepto el sulfuro de mercurio, que es rojo y se vuelve negro con la exposición a la luz. Algunas sales de mercurio (como el  $\text{HgCl}_2$ ) son lo bastante volátiles para existir como gas atmosférico (PNUMA Productos químicos, 2005).

Cuando es combinado con carbono forma compuestos conocidos como compuestos “orgánicos” de mercurio u organomercuriales, existiendo una gran cantidad de compuestos orgánicos de mercurio (como el dimetilmercurio, fenilmercurio, etilmercurio y metilmercurio), pero el más conocido de todos es el metilmercurio. Al igual que los compuestos inorgánicos de mercurio, el metilmercurio y el fenilmercurio existen como “sales” (por ejemplo, cloruro de metilmercurio o acetato de fenilmercurio).

Cuando son puros, casi todos los tipos de metilmercurio y fenilmercurio son sólidos blancos y cristalinos. En cambio, el dimetilmercurio es un líquido incoloro (Clarkson & Magos., 2006).

Varias formas de mercurio se dan de manera natural en el medio ambiente. Las formas naturales de mercurio más comunes en el medio

ambiente son el mercurio metálico, sulfuro de mercurio, cloruro de mercurio y metilmercurio. Ciertos microorganismos y procesos naturales pueden hacer que el mercurio en el medio ambiente pase de una forma a otra.

Por tratarse de un elemento, el mercurio no se puede descomponer ni degradar en sustancias inofensivas. Durante su ciclo, el mercurio puede cambiar de estado y especie, pero su forma más simple es el mercurio elemental. Una vez liberado a partir de los minerales, o depósitos de combustibles fósiles y minerales yacentes en la corteza terrestre, y emitido a la biosfera, el mercurio puede tener una gran movilidad y circular entre la superficie terrestre y la atmósfera. Los suelos superficiales de la tierra, las aguas y los sedimentos de fondo se consideran los principales depósitos biosféricos de mercurio (PNUMA Productos químicos, 2005). (Ciclo biogeoquímico del mercurio; ver anexos).

## **BASES BIOQUIMICAS DE RESISTENCIA BACTERIANA A MERCURIO**

Los iones mercúricos divalentes ( $\text{Hg}^{+2}$ ) tienen una alta afinidad por los grupos tioles de muchas proteínas y por esta razón son extremadamente tóxicos para los sistemas biológicos (Liebert *et al.*, 1999). Como respuesta a los compuestos tóxicos de mercurio distribuidos globalmente por actividades geológicas y antropogénicas, los microorganismos han desarrollado sistemas de resistencia para superar estos venenos ambientales.

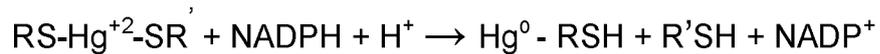
Un sistema de resistencia estudiado extensivamente basado en un conjunto de genes es el operon *mer*; sistema genético regulador del transporte y transformación del mercurio, con 4 -5 genes reguladores, que permite que las bacterias en un proceso de desintoxicación reduzcan  $\text{Hg}^{+2}$  hasta mercurio metálico volátil ( $\text{Hg}^0$ ), el cual no es tóxico, por actividad

enzimática (Konomura & Izaki., 1971; Summers., 1986; Misra T K., 1992; Silver., 1996; Osbort *et al.*, 1997).

Los determinantes de resistencia han sido encontrados en un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas aisladas de diferentes ambientes. Ellos varían en cierto número de genes involucrados y están codificados por el operon *mer*, usualmente localizado sobre plasmidos que a su vez determina resistencia a drogas (Summers & Silver., 1972; Brown *et al.*, 1986; Griffin *et al.*, 1987; Radstrom *et al.*, 1994), aunque genes de resistencia codificados por cromosomas han sido ocasionalmente identificados (Wang *et al.*, 1987; Inoue *et al.*, 1991) todos son componentes de transposones (Misra *et al.*, 1984; Kholodii *et al.*, 1993) e integrones (Liebert *et al.*, 1999).

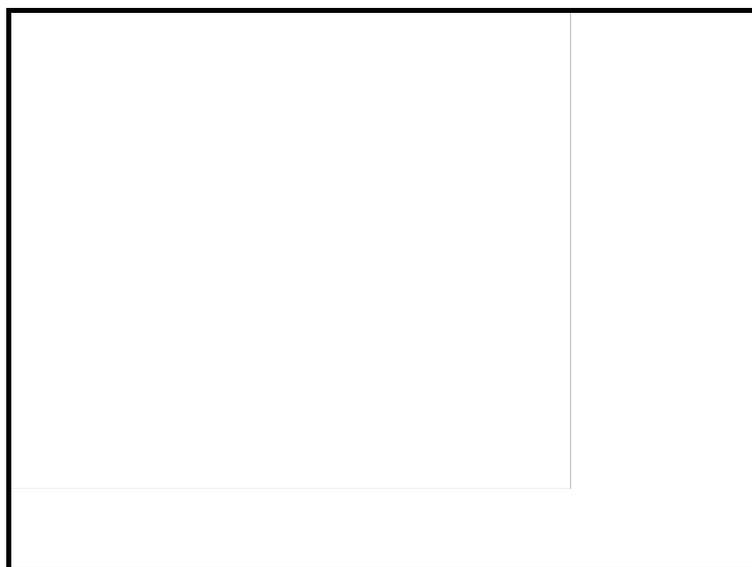
De esta forma, se han descrito dos tipos principales de resistencia, (I) determinantes *mer* de espectro reducido; los cuales confieren resistencia a la sal de mercurio inorgánico ( $\text{HgCl}_2$ ) y mercurocromo; (II) determinantes *mer* de amplio espectro los cuales confieren resistencia a órganomercuriales tales como cloruro de metilmercurio, timerosal y fenilmercurio, así como a sales de mercurio (Misra., 1992; Bogdanova *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1977; Weiss *et al.*, 1978).

Las bases bioquímicas de resistencia a iones mercúricos y órganomercuriales involucran la eliminación del metal por parte de la célula a partir del medio de crecimiento, ocurriendo una reducción de  $\text{Hg}^{+2}$  hasta gas monoatómico altamente volátil y poco reactivo ( $\text{Hg}^0$ ), todo esto por acción de la *mercurio reductasa*. Enzima bien caracterizada en cepas de *Pseudomonas*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que poseen plasmidos (Summers & Silver., 1978; Bhriain & Foster., 1986; Silver & Phung., 1996; Osbort *et al.*, 1997). Esta reductasa es una flavoenzima citoplasmática dependiente de NADPH que cataliza la reacción:



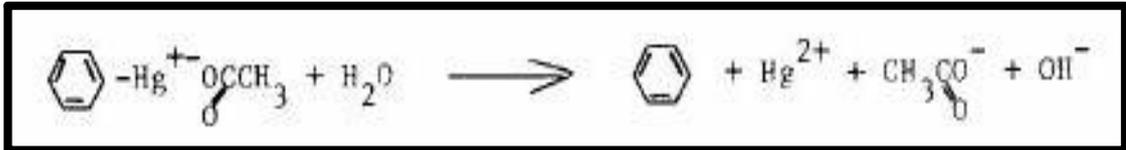
Donde RSH y R'SH representan grupos tioles donadores y R un aminoácido como la cisteína, muy probablemente dentro del sitio activo de la enzima (Brown *et al.*, 2002). Siendo entonces el mercurio metálico  $\text{Hg}^0$  el producto final volatilizado a causa de las altas presiones de vapor (Summers & silver 1978).

Los iones de mercurio presentes en el medio se difunden a través de la membrana hasta el interior de la bacteria por una serie de proteínas transportadoras. Este mecanismo involucra ligamiento de  $\text{Hg}^{+2}$  con residuos de cisteína sobre *merP*, una pequeña proteína localizada en el periplasma, la cual transfiere el átomo de  $\text{Hg}^{+2}$  a un par de residuos de cisteína sobre *merT* o *merC*, proteínas de transporte de la membrana interna. De *merT* o *merC* el  $\text{Hg}^{+2}$  se transfiere a un par de cisteína del sitio activo en *merA* (mercurio reductasa). Aquí el  $\text{Hg}^{+2}$  es reducido a  $\text{Hg}^0$  y luego liberado al citoplasma para finalmente ser volatilizado de la célula (*fig 1.*) (Hamlett *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2002; Nascimento & Chatote-Souza., 2003).



**Fig 1.** Mecanismo de reducción de  $\text{Hg}^{+2}$  hasta  $\text{Hg}^0$  a través de la acción de las proteínas mer. Adaptado de **Guimarães P L., 2004**

La bioquímica de resistencia de amplio espectro a órganomercuriales involucra, además del mercurio reductasa, una enzima hidrolasa inducible que primero corta la unión Hg – C (liasa órganomercurial *merB*).



El  $\text{Hg}^{+2}$  resultante es luego reducido por la mercurio reductasa y volatilizado (Schottel, 1978).

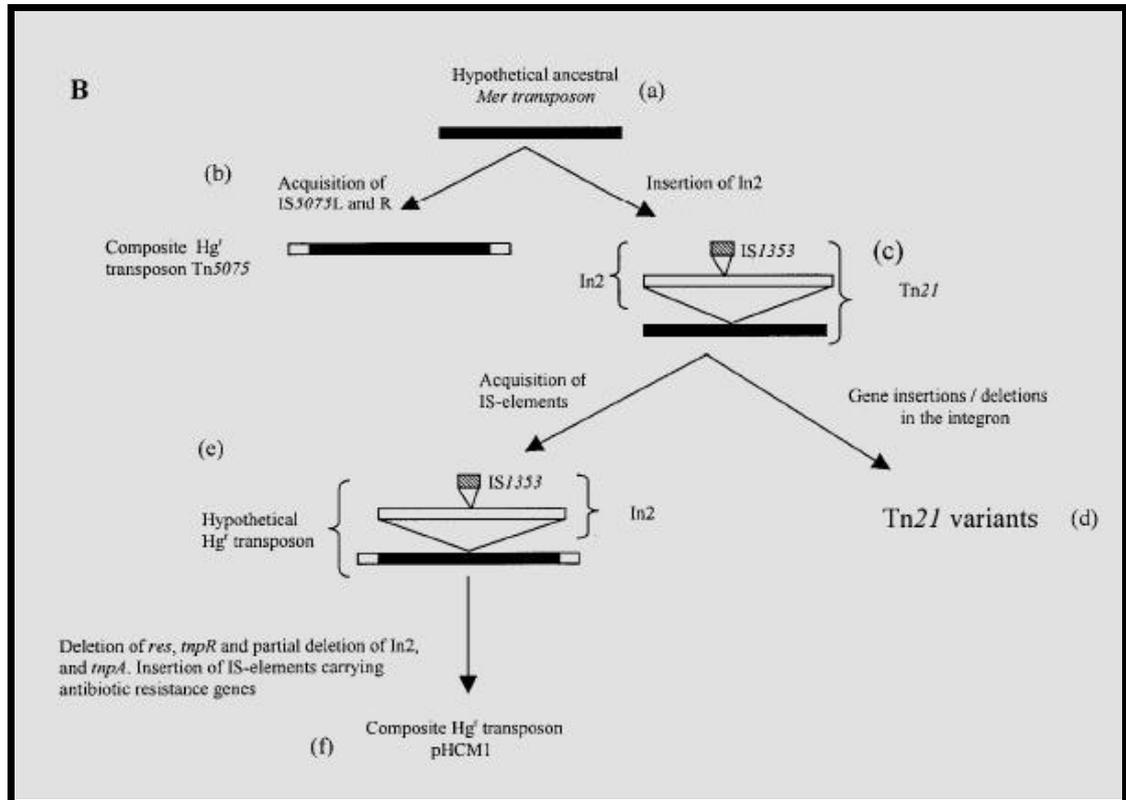
### ORIGEN Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL OPERON *MER*

La naturaleza y organización de genes que codifican resistencia a mercurio ha sido un área de intensos estudios. Uno de estos indica que la presencia de genes *mer* en bacterias de sedimentos profundos sugiere que *mer* es un sistema ancestral, donde las bacterias ancestrales transportaban los genes de resistencia en respuesta al incremento en los niveles de mercurio ambiental, quizás como resultado de actividad volcánica (Osborn *et al.*, 1997).

Otros como Tanaka *et al.* (1983), propusieron un modelo evolutivo para genes *mer*, en el cual una familia **ancestral** de elementos móviles transponibles (transposon *mer*), representados por Tn2613 y Tn501 podrían haber evolucionado, conduciendo a la generación de varios transposones multiresistentes, a través de una dinámica de alteración de secuencias de ADN.

Más recientemente Ashraf y colaboradores (2003), demostraron que los determinantes de resistencia mercurio relacionados con los transposones

Tn21, Tn1696 y Tn5053 de enterobacterias de la colección Murria, de la era preantibiótica, conservan linajes evolutivos de un operón *mer* ancestral. (*Fig 2.*)

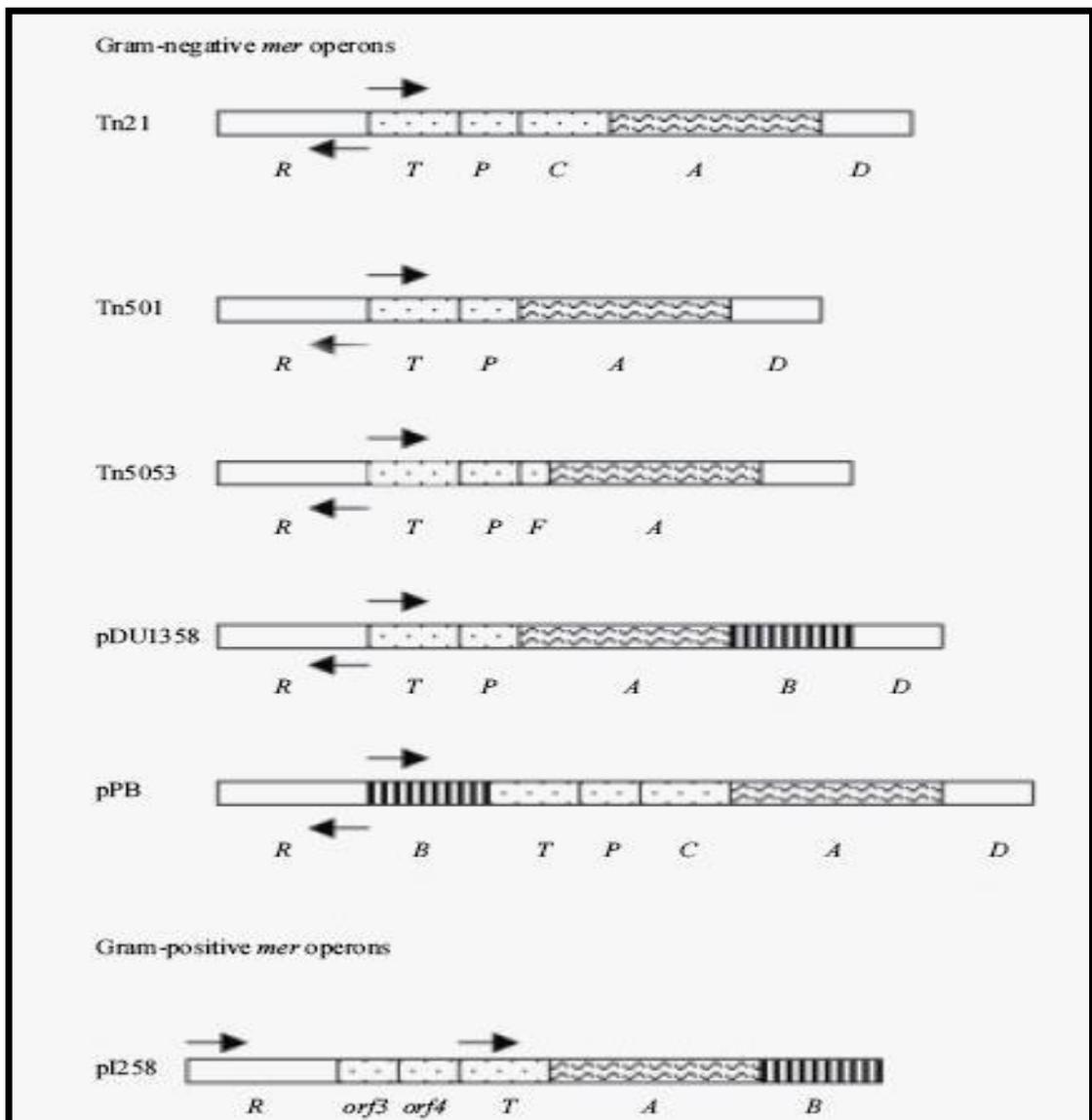


**Fig 2.** Modelo evolutivo propuesto para Tn5075, Tn21 y transposones ligados a Tn21 en pHCM1. Un transposón *mer* ancestral (a) pudo adquirir cualquier IS5075L y IS5075R para formar el Tn5075 (b) o un integron relacionado a In2, resultando en la formación de Tn21 (c). Inserción y delección de genes en In2 condujo a variantes Tn21 (d), o Tn21 podría haber adquirido elementos de inserción IS, para conducir a la formación de un precursor a transposones ligados a Tn21 en el plásmido pHCM1 (e). Delecciones de genes de transposición y delecciones parciales de In2, seguido por inserciones de genes de resistencia antibiótica que transportan elementos IS, resultó en la formación de transposones ligados a Tn21 en pHCM1 (f). Adaptado de Ashraf *et al.*, 2003.

## GENES MER.

Los análisis de secuencias de ADN sobre genes y operones *mer* han revelado variaciones genéticas tanto en la estructura del operón como entre genes individuales de diferentes operones (Summers., 1992).

El modelo general del operon *mer* esta constituido por genes que codifican proteínas reguladoras (*merR*, *merD*), de transporte (*merP*, *merT* y/o *merC*, *merF*) y reducción (*merA*). (**Fig 3**); en algunos casos se conoce que la resistencia de amplio espectro al mercurio requiere de un gen adicional (*merB*), confiere resistencia a muchos organomercuriales (Osborn *et al.*, 1997; Nascimento & Chatote-Souza., 2003).



**Fig 3.** Representación esquemática de operones *mer* en bacterias Gram positivas y Gram negativas, derivados de datos de secuencias de ADN: Transposon Tn21 de el plasmido NR1 de *Shigella flexneri*; transposon Tn501 de el plasmido pVS1 de *Pseudomonas aeruginosa*; plasmido pDU1358 de *Serratia marcescens*; transposon Tn5053 de el plasmido pMR de *Xanthomonas sp.*; plasmido pPB de *Pseudomonas stutzeri*, y plasmido pl258 de *Staphylococcus aureus*. Adaptado de Nascimento & Chartone – Souza., 2003.

### **Gen metaloregulador (*merR*).**

El gen *merR*, considerado uno de los sistemas mejor estudiados dentro de la familia de reguladores que responden a estímulos ambientales y activan la expresión de genes (Brown *et al.*, 2002).

*MerR* es un polipéptido de 144 aminoácidos que regula el operon *mer* por tres vías. (I) En ausencia de mercurio, *merR* se une a la región promotor/operador, causando que el ADN se pliegue en la región *merOP*, y la transcripción de los genes *mer* sea reprimida; hay que anotar que la ARN polimerasa se une a la proteína *merR* y al ADN pero la expresión no ocurre debido a la distorsión espacial del ADN (Ross Wilma *et al.*, 1989). (II) Cuando  $Hg^{+2}$  se une a la proteína *merR* ocurre un cambio conformacional, permitiendo que la ARN polimerasa inicie la transcripción de los genes estructurales, sin cambiar el pequeño espacio de represión de *merR* (Ross Wilma *et al.*, 1989; Summers., 1992). El dominio de unión de *merR* al metal contiene residuos de cisteína (Cys80 – Cys128) y son lo suficiente para formar un único dímero de alta afinidad por  $Hg^{+2}$  (Zeng Q *et al.*, 1998). Finalmente *merR* regula negativamente su propia transcripción, sin importar la presencia o ausencia de  $Hg^{+2}$ , por la unión a la región promotora *merR*, la cual es distinta a los demás genes (Liebert *et al.*, 1999).

*MerR* y los genes *merTPCAD* son transcritos en direcciones diferentes a partir de una región promotor/Regulador (*merOP*) de 71 pb (Liebert *et al.*, 1999); sin embargo en bacterias Gram positivas el *merR* del plasmido pl258 de *Staphylococcus aureus* y RC607 de *Bacillus sp* son transcritos en la misma dirección de los genes estructurales (Wang *et al.*, 1989; Nascimento & Chartone-Souza., 2003). En el operon *mer* puede estar presente un promotor más distal (*merD*), el cual es co-transcrito con los genes estructurales. El papel sugerido para *merD*, es actuar como una proteína reguladora secundaria que también se une a la misma región

Promotor/Regulador de *merR*, aunque muy débilmente (Lee *et al.*, 1989; Mukhopadhyay *et al.*, 1991).

### **Genes de Transporte Hg<sup>+2</sup> (*merT*, *merP* y *merC*).**

Un número de genes estructurales se encuentran hacia el sitio *merOP*, los cuales están involucrados en la entrada de mercurio hacia la célula. Todos los operones *mer* tienen *merT* y *merP*; sin embargo, algunos operones como el transportado por Tn21 tienen *merC*, un gen localizado entre *merP* y *merA* (Fig. 3) (Nascimento & Chatote-Souza., 2003).

Estos genes están espaciados estrechamente; *merT* (351pb) esta separado por solo 13pb de *merP* (276pb), mientras que *merP* se separa de *merC* (423pb) por solo 35pb (Liebert *et al.*, 1999). Ambos *merT* y *merC* son proteínas de membrana interna presuntamente con tres y cuatro  $\alpha$  hélices transmembrana respectivamente. *MerP* está localizada en el periplasma y esta compuesta por cuatro cadenas  $\beta$  y dos  $\alpha$  hélices (Steel R *et al.*, 1997).

*MerT* y *merP* son esenciales para la expresión total de la resistencia a Hg<sup>+2</sup>, en contraste el gen *merC* aparentemente no es necesario para la expresión; ejemplo de esto son los transposones Tn501 y Tn5053 los cuales carecen de *merC* y expresan totalmente el fenotipo de resistencia a iones mercurio. Además deleciones de *merC* del locus *mer* de Tn21 no tienen ningún efecto sobre la resistencia (Hamlett *et al.*, 1992).

Recientemente un nuevo gen *mer* implicado en el transporte de mercurio es el *merF*, encontrado en el plasmido pMER327/419 de *Pseudomonas fluorescens* entre *merP* y *merA* (Wilson *et al.*, 2000).

### **Gen mercurio reductasa (*merA*).**

El gen *merA* codifica una enzima redox citoplasmática de 564 aminoácidos y es el gen más grande del operon *mer*. En todos los operones descritos hasta ahora se encuentra ubicado en los genes transportadores, funcionando como un homodimero, y dos pares de residuos cisteína; un par de una subunidad (Cys135 y Cys140) que activa las reacciones *Redox*, mientras que el otro par (Cys561 y Cys562) hace parte del sitio activo de la subunidad catalítica. (Distefano *et al.*, 1990).

### **Gen *merB*.**

El gen *merB* cuando está presente en el locus *mer* codifica la enzima liasa órganomercurial (*merB*), que tiene una amplia especificidad por sustratos orgánicos que contengan mercurio. En muchos casos el gen *merB* ha sido mapeado inmediatamente después del gen *merA* y es expresado junto con los demás genes estructurales (Guimarães P L., 2004); sin embargo como se observo en *Pseudomonas stutzeri*, el gen *merB* se encuentra entre *merR* y *merT* con una región *merOP* extra (Weiss *et al.*, 1977; Walsh *et al.*, 1988).

Otros genes que codifican resistencia órganomercurial han sido identificados y designados como *merG* y *merE*, localizados entre *merA* y *merB* sobre plasmidos de resistencia de amplio espectro (Kiyono & Pan-Hou., 1999).

## **RESISTENCIA BACTERIANA MERCURIO – ANTIBIOTICOS**

La exposición a metales selecciona indirectamente bacterias resistentes a diferentes tóxicos, particularmente a los antibióticos. La corresistencia a metales y antibióticos ha sido encontrada en numerosos aislamientos clínicos y ambientales.

Múltiples genes que codifican para resistencia a metales y antibióticos son comúnmente encontrados sobre el mismo plasmido o transposones, por ejemplo el transposon *Tr21* confiere co-resistencia a mercurio, aminoglucosidos y sulfonamidas. En algunos casos, simples enzimas funcionan como bomba de flujo para múltiples metales y antibióticos; esto es definido como resistencia cruzada.

En otro caso la selección directa para resistencia a metales podría indirectamente seleccionar organismos o elementos genéticos móviles, confiriendo resistencia a antibióticos. En consecuencia, frecuencias elevadas de resistencia a antibióticos han sido observadas en fracciones cultivables de un grupo de microbios en corrientes de agua dulce contaminada con metales, áreas costeras y en el tracto digestivo de primates con amalgamas dentales que contenían mercurio (Stepanauskas *et al.*, 2005).

La resistencia a mercurio en bacterias parece estar ligada con resistencia antibióticos. La transferencia de plasmidos que portan resistencia antibióticos en ciertas bacterias, también podría transferir la resistencia a mercurio. Una hipótesis es que la presión selectiva sobre los organismos para la resistencia a mercurio es debido a la diseminación de su uso como desinfectante y en procesos de esterilización en hospitales, semejante a la presión ejercida por los antibióticos (Guimarães., 2004).

Los estudios sobre las bacterias resistentes a mercurio iniciaron en 1960, cuando Moore fue el primero en reportar resistencia bacteriana a sales mercuriales orgánicas e inorgánicas en un *Staphylococcus aureus* aislado de una muestra clínica, el cual fue también resistente a penicilina. Estas sales fueron utilizadas extensivamente por mucho tiempo como desinfectantes tópicos y antisépticos en hospitales y en la comunidad (Hobman *et al*/2002).

Luego en 1964, Richmond y John, en Ucrania y Novick en los Estados Unidos (1968), demostraron que tanto la resistencia a penicilina como al

mercurio en cepas de *Staphylococcus aureus* estuvieron genéticamente ligados a una nueva clase de elementos genéticos móviles llamados plasmidos (Barkay *et al.*, 2003).

Hoy, cuatro décadas después de intensos estudios se sabe que el eficiente sistema de resistencia a mercurio (operon *mer*), expresado por un amplio espectro de bacterias gram positivas y gram negativas de muchos ambientes; está distribuido universalmente gracias a su ubicuidad sobre elementos genéticos móviles llamados plasmidos, los cuales a su vez son capaces de adquirir genes de multiresistencia a compuestos antimicrobianos (antibióticos), para luego participar en la ascendente transferencia horizontal de genes que de una u otra forma han tenido un papel importante en los procesos de adaptación evolutiva.

## REFERENCIAS

- Ashraf M. M. Essa., Daniel J. Julian., Stephen P. Kidd., Nigel L. Brown and Jon L. Hobman. (2003). Mercury Resistance Determinants Related to

Tn21, Tn1696, and Tn5053 in Enterobacteria from the Preantibiotic Era. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47** (3): 1115–1119.

- Barkay T., Miller M S., Summers A O. (2003). Bacterial mercury from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:355-384.
- Tamar Barkay and Irene Wagner-Döbler. (2006). Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. *Advances In Applied Microbiology*, Volume **57**.
- Bhriain N N., and Foster T J. (1986). Polypeptides specified by the mercury resistance (*mer*) operon of plasmid R100. *Gene*. **42**: 323-330.
- Bogdanova E S., I. A. Bass., L. S. Minakhin., M. A. Petrova., S. Z. Mindlin., A. A. Volodin., E. S. Kalyaeva., J. M. Tiedje., J. L. Hobman., N. L. Brown and V. G. Nikiforov. (1998). Horizontal spread of *mer* operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiolcgy*. **144**: 609–620
- Brown N. L., Misra T. K., Winne J. N., Schmidt A., Seiff M. and Silver S. (1986). The nucleotide sequence of the mercury resistance operon of plasmid R 100 and transposon Tn501: further evidence for *mer* genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen. Genet.* **202**:143-151.
- Brown N L., Y.C. Shih., C. Leang., K. J. Glendinning., J. L. Hobman and J. R. Wilson. (2002). Mercury transport and resistance. *Biochemical Society Transactions*. **30**: 715-718.
- Clarkson Thomas W. (1997). The toxicology of mercury. [\*Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.\* \*\*34\*\*\(4\):369-403.](#)
- Clarkson Thomas W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect.* **110** Suppl 1:11-23. Review.
- Clarkson Thomas W & Laszlo Magos. (2006). The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicolcgy*. **36**:609–662.
- Distefano, M. D., M. J. Moore, and C. T. Walsh. (1990). Active site of mercuric reductase resides at the subunit interface and requires Cys-135 and Cys-140 from one subunit and Cys-558 and Cys-559 from the adjacent subunit: evidence from *in vivo* and *in vitro* heterodimer formation. *Biochemistry*. **29**: 2703–2713.
- Fitzgerald W F. & Clarkson T W. (1991). Mercury and momomethylmercury: present and future concerns. *Enviro. Health Perspect.* **96**:159-66.
- Gerlach, A. (1981). Marine pollution: diagnosis and therapy. New York, N. Y. Springer – Verlag.

- Griffin H. G., Foster T. J., Misra T. K and Silver S. (1987). Cloning and DNA sequence of the mercuric–and organomercurials-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc. Natl. Acad. USA.* **84**:3112-3116.
- Guimarães Barrocas Paulo Rubens. (2004). assessment of mercury (ii) species bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor. The Florida state university. College of arts and sciences.
- Hamlett Nancy V., Edwin C. Landale., Brent H. Davis., and Anne O. Summers. (1992). Roles of the Tn21 merT, merP, and merC Gene Products in Mercury Resistance and Mercury Binding. *Journal of Bacteriolgy.* **174**(20): 6377-6385.
- Hobman J L., A M M Essa. & N L Brown. (2002). Mercury resistance (*mer*) operons in enterobacterias. *Biometal.* **30**: 719-721.
- Inoue C., Sugawara K. and kusano T. (1991). The *merR* regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from the *merI* structural genes. *Mol. Microbiol.* **5**: 2707-2728.
- Kholodii G Y., Yurieva O V., Lomovskaya O L., Gorlenco Z M., Mindlin S Z and Nikiforov V G. (1993). Tn5053, a mercury resistance transposon with integron ends. *Journal. Mol. Boil.* **230**.1103-1107.
- Kiyono M & Pan-Hou H. (1999). The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *Journal. Bacteriol.* **81**: 726-730.
- Konomura I & Izaki K. (1991). Mechanism of mercury chloride resistance in microorganism. I. vaporization of a mercury compound from mercury chloride by multiple drug resistance strains of *Escherichia coli*. *Journal. Biochem.* **70**:885-893.
- Lee, I. W., B. D. Gambill, and A. O. Summers. 1989. Translation of *merD* in Tn21. *Journal. Bacteriol.* **171**: 2222–2225.
- Liebert Cynthia., Ruth M Hall. and Anne O Summers. (1999). Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome. *Microbioigy and moiecuilar biolcgy reviews.* **63**. (3): 507–522.
- Misra T K. (1992). Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid.* **27** (1): 4-16.
- Misra T K., Brown N. L., Fritsinger D C., Pridmore R D., Branes W M., Haberstroh L and Silver S. (1984). The mercuric ion resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the beginning of the operon including the regulatory region and first two structural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 5975-5979.

- Mukhopadhyay D H., Yu H., Nucifora G. and Misra T K. (1991). Purification and functional characterization of *merD*: a coregulator of the mercury resistance operon in Gram – negative bacteria. *J. biol. Chem.* **266**: 18538-18542.
- Nriagu J O., Pfeiffer W C., Malm O., Magalanes de Souza y Mierle G. (1992). Mercury pollution in Brazil. *Nature* **356** (6368): 389.
- Nascimento & Chartone-Souza. (2003). Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular research.* **2** (1): 92-101.
- Osborn M., Bruce K D., Strike P. and Ritchie D A. (1997). Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS microbiol. Rev.* **19**: 239-262.
- PNUMA. (Programa de las naciones unidas para el medio ambiente). Productos químicos. Ginebra, Suiza (2005). Evaluación mundial sobre el mercurio.
- Radstrom P., Skold O., Swedberg G., Fensburg J., Roy P. H. and Sundstrom L. (1994). Transposon Tn5090 of the plasmid R751, which carries integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *Journal of Bacteriolcgy.* **176**: 3257-3268.
- Robinson Jayne B. & Tuovinen Olli H.(1984). Mechanisms of Microbial Resistance and Detoxification of Mercury and Organomercury Compounds: Physiological, Biochemical, and Genetic Analyses. *Microbiolc gical reviews* **48** (2):95-124.
- Ross, W., S.-J. Park and A. O. Summers. (1989). Genetic analysis of transcriptional activation and repression in the Tn21 *mer* operon. *J. Bacteriol.* **171**: 4009–4018.
- Schottel, J. L. (1978). The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253**:4341-4349.
- Silver S. (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions – a review. *Gene.* **179**: 9-19.
- Silver S. & Phung L T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789.
- Steel, R. A., and S. J. Opella. (1997). Structures of the reduced and mercury bound forms of MerP, the periplasmic protein from the bacterial mercury detoxification system. *Biochemisty* **36**: 6885–6895.
- Stepanauskas Ramunas., Glenn Travis C., Jagoe Charles H., Tuckfield R. Cary, Lindell Angela H, and Macarthur Jv. (2005). Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 3671-3678.

- Summers Annie. O. (1986). Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 607-634.
- Summers Anne O. (1992). Minireview. Untwist and Shout: a Heavy Metal-Responsive Transcriptional Regulator. *Journal of Bacteriology.* **174** (10): 3097-3101.
- Summers A. O & Silver S. (1972). Mercury resistance in a plasmid – bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal. Bacteriol.* **112**:1228-1236.
- Summers A. O & Silver S. (1978). Microbial transformations of metal. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**:637-672.
- Tanaka, M., T. Yamamoto, and T. Sawai. (1983). Evolution of complex resistance transposons from an ancestral mercury transposon. *J. Bacteriol.* **153**:1432–1438.
- Walsh C T., Distefano M D., Moore M J., Shewchuk LM. And Verdine GL. (1998). Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts. *FSAB J.* **2** (2): 124-30.
- Wang Y., Mahler I., Levinson H. S. and Halvorson H. O. (1987). Cloning and expression In *Escherichia coli* of chromosomal mercury resistance genes from a *Bacillus sp.* *Journal of Bacteriology.* **169**:4848-4851.
- Wang, Y., Moore, M., Levinson, H. S., Silver, S., Walsh, C. & Mahler, I. (1989). Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance determinant from a *Bacillus sp.* with broad-spectrum mercury resistance. *J Bacteriol.* **171**: 83±92.
- Weiss, A. A., J. L. Schottel, D. L. Clark, R. G. Beller, and S. Silver. 1978. Mercury and organomercurial resistance with enteric, staphylococcal, and pseudomonad plasmids, p. 121-124. In D. Schlessinger (ed.), *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Weiss Alison A., Sandra D. Murphy and Simon Silver. (1977). Mercury and Organomercurials Resistances Determined by Plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology.* **132** (1): 197-208.
- Wilson J R., Leang G., Morby A P., Hobman J L. and Brown N L. (2000). MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercury ion transporters? *FEBS Lett.* **472**: 78-82.
- Zeng, Q., C. Stålhandske, M. C. Anderson, R. Scott, and A. O. Summers. (1998). The core metal-recognition domain of MerR. *Biochemistry* **37**:15885–15895.

**ANEXOS**

**ANEXO 1. FORMATO PARA LA RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.**

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA – CLINICA HENRIQUE DE LA VEGA

FECHA DE RECOLECCION: \_\_\_\_\_

SERVICIO HOSPITALARIO: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_

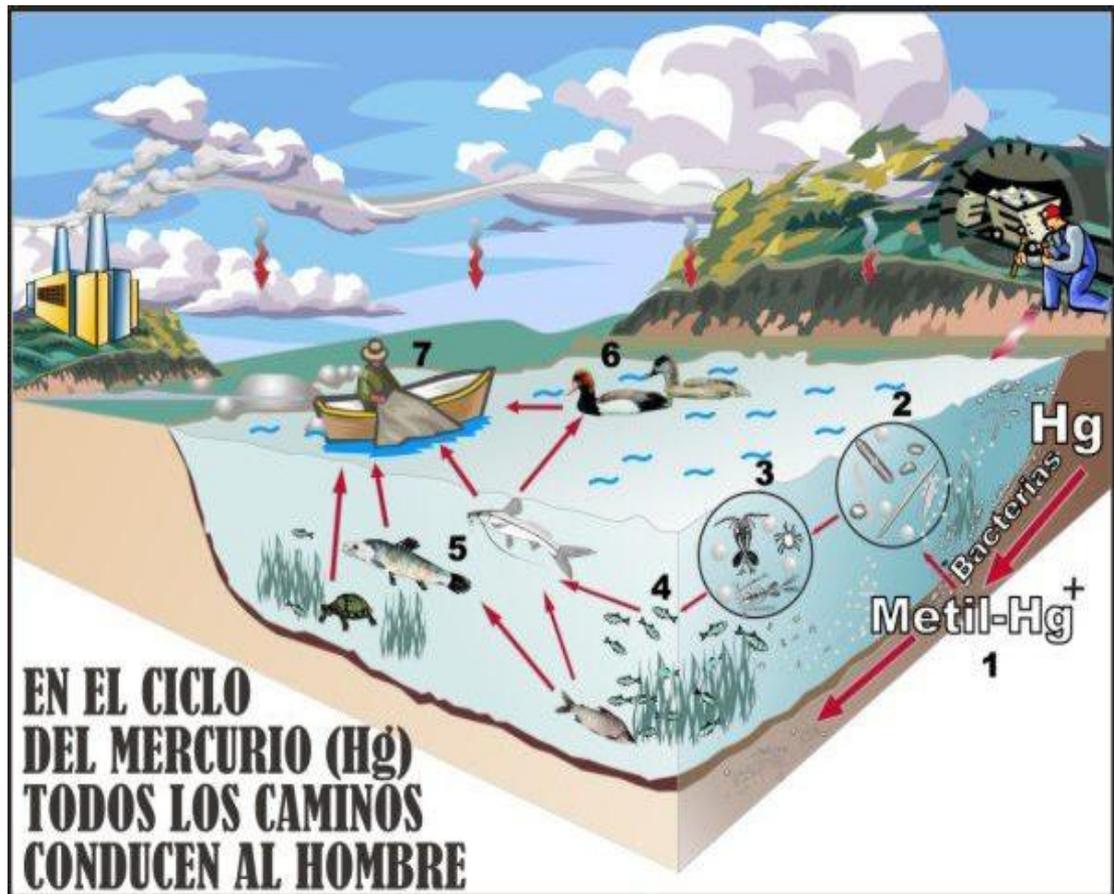
ORIGEN DE LA MUESTRA: \_\_\_\_\_

M.O AISLADO: \_\_\_\_\_

ANTIBIOGRAMA:

OBSERVACIONES:

## ANEXO 2. CICLO BIOGEOQUIMICO DEL MERCURIO.



Ciclo biogeoquímico del mercurio. Adaptado de [www.unicartagena.edu.co/Mercurio.htm](http://www.unicartagena.edu.co/Mercurio.htm)

### ANEXO 3. ACTIVIDADES ACADÉMICAS.

Asistencia al módulo de Bacteriología dictado a los estudiantes de Medicina IV semestre. Primer Semestre 2006.

#### TEMARIO:

- Introducción a la bacteriología.
- Cocos Gram + aerobios *Staphylococcus*.
- Cocos Gram + aerobios catalasa negativos.
- Bacilos Gram + aerobios.
- Bacilos Gram + anaerobios.
- Bacilos Gram + anaerobios no esporulados.
- Cocos gram (-) aerobios. Género: *Neisseria*.
- Bacilos Gram (-) pleomórficos. Género: *Haemophilus influenzae*.
- Familia *Enterobacteriaceae* "ENTEROBACTERIAS"
- Bacilos Gram (-) curvos: *Vibrio*, *Aeromonas*, y *Plesiomonas*.
- Bacilos Gram (-) Anaerobios No esporulados: *Bacteroides-Fusobacterium-Porphyromonas-Prevotella*.
- Bacterias intracelulares: *rickettsia* y *Chlamydia*.
- Bacilos Acido Alcohol Resistentes: *Mycobacterium – Nocardia*.
- Espiroquetas: *Treponema – Borrelia- Leptospira*.

#### SEMINARIOS:

- *Pseudomonas*.
- *Campylobacter* y *helicobacter*.
- *Bordetella*, *Francisella*, *Brucella*.
- Resistencia antimicrobiana.