



UNIVERSIDAD DE JAÉN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL



**EVALUACIÓN DE LA CORRESISTENCIA A METALES
PESADOS Y ANTIBIÓTICOS EN MICROORGANISMOS
PROCEDENTES DE SUELOS DE OLIVAR ECOLÓGICO
Y TRADICIONAL DE LA PROVINCIA DE JAÉN.
MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS.**

PRESENTADA POR:

Nicolás Alejandro Glibota Rschichuchi

DIRIGIDA POR:

**Elena Ortega Morente, María José Grande Burgos y Antonio
Gálvez del Postigo**

JAÉN, 28 de Octubre de 2019

ISBN

**EVALUACIÓN DE LA CORRESISTENCIA A METALES PESADOS Y
ANTIBIÓTICOS EN MICROORGANISMOS PROCEDENTES DE SUELOS
DE OLIVAR ECOLÓGICO Y TRADICIONAL DE LA PROVINCIA DE JAÉN.
MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS.**

**EVALUATION OF CO-RESISTANCE TO HEAVY METALS AND ANTIBIOTICS IN
BACTERIA FROM SOILS OF ORGANIC AND TRADITIONAL OLIVE TREE
FARMS. MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED**

Memoria para optar al grado de Doctor

Jaén, Octubre de 2019



Fdo.: Nicolás Alejandro Glibota Rschichuchi

Aspirante al Grado de Doctor

Los Directores del trabajo:



Fdo.: Elena Ortega Morente



Fdo: María José Grande Burgos



Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud.

Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

Los directores de tesis D^a. Elena Ortega Morente, D^a María José Grande Burgos y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Evaluación de la coexistencia a metales pesados y antibióticos en microorganismos procedentes de suelos de olivar ecológico y tradicional de la provincia de Jaén. Mecanismos moleculares implicados.”** presentado por D. Nicolás Alejandro Glibota Rschichuchi ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor en la modalidad de Mención Internacional. El doctorando ha realizado una estancia en la Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brasil, desde mayo a julio de 2016 y una segunda estancia en la Università degli Studi della Basilicata, Potenza, Italia, de febrero a mayo de 2017.

Jaén, octubre de 2019



Fdo.: Elena Ortega Morente



Fdo.: María José Grande Burgos



Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Este trabajo ha sido subvencionado por el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (Estructura de investigación AGR230), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). El doctorando ha disfrutado igualmente de la ayuda de movilidad: ERASMUS+ y ERASMUS+ ceiA3.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2 - INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2.1 - METALES PESADOS..... | 14 |
| 2.1.1 - <i>Cadmio</i> | 17 |
| 2.1.2 - <i>Cobre</i> | 20 |
| 2.1.3 - <i>Níquel</i> | 24 |
| 2.1.4 - <i>Plomo</i> | 25 |
| 2.1.5 - <i>Zinc</i> | 28 |
| 2.1.6 - <i>Tolerancia y toxicidad de los metales pesados</i> | 29 |
| 2.2 - MECANISMOS DE RESISTENCIA | 31 |
| 2.2.1 - <i>Unión y transporte de iones metálicos</i> | 32 |
| 2.2.2 - <i>Mecanismos de exporte</i> | 33 |
| 2.2.3 - <i>Mecanismos de captación</i> | 33 |
| 2.2.4 - <i>Biotransformación de metales</i> | 34 |
| 2.2.5 - <i>Resistencia determinada por componentes genéticos</i> | 35 |
| 2.2.6 - <i>Homeostasis de Cobre</i> | 35 |
| 2.2.7 - <i>Homeostasis de Cadmio, Plomo y Zinc</i> | 41 |
| 2.2.8 - <i>Homeostasis de Níquel</i> | 45 |
| 2.3 - ANTIBIÓTICOS | 48 |
| 2.3.1 - <i>Historia de los antibióticos</i> | 49 |
| 2.3.2 - <i>Antibióticos en la naturaleza</i> | 51 |
| 2.3.3 - <i>Clasificación de antibióticos</i> | 53 |
| 2.3.4 - <i>Resistencia a antibióticos</i> | 55 |
| 2.3.5 - <i>Transmisión horizontal de genes y elementos genéticos móviles</i> | 57 |
| 2.3.6 - <i>Elementos genéticos móviles</i> | 59 |
| 2.3.6 - <i>Transferencia de genes en la cadena alimentaria</i> | 63 |
| OBJETIVOS | 65 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 69 |
| 4.1 - RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE EN SUELO..... | 71 |
| 4.2 - AISLAMIENTO BACTERIANO Y PURIFICACIÓN | 76 |
| 4.3 - ESTIMACIÓN DE LA TOLERANCIA DE LAS CEPAS AISLADAS A LOS METALES | 77 |
| 4.4 - <i>Identificación bacteriana</i> | 77 |
| 4.5 - DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS | 78 |
| 4.6 - DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA | 79 |
| 4.7 - GENES DE TOLERANCIA A METALES PESADOS | 81 |
| 4.8 - ESTADÍSTICA | 84 |
| RESULTADOS..... | 87 |
| 5.1 - TOLERANCIA A METALES PESADOS | 89 |
| 5.2 - CONCENTRACIÓN DE COBRE EN MUESTRAS DE SUELO | 90 |
| 5.3 - IDENTIFICACIÓN DE CEPAS TOLERANTES A METALES..... | 91 |
| 5.4 - DETERMINANTES GENÉTICOS QUE CODIFICAN LA TOLERANCIA A METALES PESADOS Y LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS | 101 |

| | |
|---|------------|
| TABLA 7. DETERMINANTES GENÉTICOS DE TOLERANCIA A METALES PESADOS, RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y BOMBAS DE EXPORTE INESPECÍFICAS Y FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS AISLADAS DEL SUELO DE OLIVARES. | 103 |
| 5.5 - ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE TOLERANCIA A METALES PESADOS Y LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS | 108 |
| 5.6 - ASOCIACIÓN ENTRE LOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE TOLERANCIA A METALES PESADOS Y DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS | 110 |
| DISCUSIÓN | 113 |
| CONCLUSIONES..... | 125 |
| BIOBLOGRAFÍA | 131 |

RESUMEN

1 - RESUMEN

La posibilidad de que la contaminación con metales pesados pueda actuar como una presión selectiva persistente que favorezca la diseminación de resistencia a antimicrobianos en los ambientes naturales es motivo de preocupación. Los objetivos de este trabajo han sido aislar e identificar bacterias tolerantes a metales pesados a partir de suelos de olivar tratados de forma rutinaria con cobre, evaluar la tolerancia de los aislados a otros metales y su resistencia a antibióticos de interés clínico, y detectar posibles asociaciones significativas entre la presencia de genes de tolerancia a metales pesados y genes de resistencia a antibióticos.

Las concentraciones de cobre en el suelo oscilaron entre 2 y 129 mg/kg, con un valor promedio de 15 mg/kg. A partir de los 45 suelos de olivar muestreados se obtuvieron un total de 595 aislados bacterianos para posterior estudio. Se detectaron concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) ≥ 16 mM con elevada frecuencia para cobre (57% de los aislados), zinc (37%) y plomo (62%). Para el níquel, solo un 3% de los aislados presentaba MICs ≥ 12 mM. Se seleccionaron un total de 96 cepas tolerantes a metales representativas de los 45 suelos para su posterior identificación y determinación de la resistencia a antimicrobianos. La mayoría de las cepas pertenecían al género *Pseudomonas* (37%), seguido de *Bacillus* (23%) y *Chryseobacterium* (20%). El resto fueron identificadas como *Variovorax* (6%), *Stenotrophomonas* (4%), *Serratia* (2%), *Burkholderia* (2%), o bien como *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Janthinobacterium* y *Sphingobacterium* (1% cada uno). La tolerancia más elevada al cobre se detectó en las cepas de *Pseudomonas*. Más del 75% de las cepas con una elevada tolerancia al cobre

eran resistentes a vancomicina, mientras que un 50% lo eran a ampicilina y un 40% a eritromicina o a trimetoprim-sulfametoxazol.

La evaluación de la presencia simultánea de genes para tolerancia a metales pesados y genes de resistencia a antibióticos en las cepas tolerantes/resistentes a ambas categorías de compuestos reveló asociaciones positivas significativas entre la presencia de genes de tolerancia al cobre y genes de resistencia a beta-lactámicos y a tetraciclinas. Los genes *pcoA*, *pcoD* y *pcoR* del operón *pcoABCDRSE* también mostraron una asociación positiva con la resistencia fenotípica a ceftazidima, y el gen *smtA* implicado en la resistencia al plomo también mostraba una asociación positiva con la resistencia a vancomicina. También se encontraron asociaciones significativas entre los genes *cop* y las resistencias a eritromicina, gentamicina, ceftazidima y vancomicina. La presencia del gen *czcD* (implicado en la regulación del sistema de exporte para cobalto, cadmio y zinc) también se asoció con resistencias a eritromicina, ampicilina, vancomicina y trimetoprim-sulfametoxazol, y el gen *zntA* que codifica para una ATPasa de tipo P se asoció con resistencias a eritromicina, gentamicina, vancomicina, trimetoprim-sulfametoxazol y ampicilina.

Como conclusión, podemos decir que las bacterias aisladas de los suelos de olivar muestran tolerancia a metales pesados, principalmente cobre, pero también zinc y plomo, y en porcentajes menores a cadmio y a níquel, y presentan también resistencias a antibióticos de importancia para la salud que podrían ocasionar problemas en el ámbito clínico. La presencia simultánea de genes de tolerancia a metales pesados y genes de resistencia a antibióticos y las asociaciones positivas significativas encontradas entre ambos tipos de genes podrían proporcionarnos claves adicionales para entender

el posible papel de la presencia de genes de tolerancia a metales pesados en la co-selección de resistencias a antibióticos.

SUMMARY

There is growing concern that heavy metal pollution may act as persistent selective pressure that favours the spread of antimicrobial resistance in natural environments. The aim of this study was to isolate and identify metal tolerant bacteria from soils in olive tree fields routinely treated with copper derived compounds, to evaluate the tolerance of bacterial strains to other metals and their resistance to clinically relevant antibiotics, and to find significant associations between metal tolerance and antibiotic resistance genes.

Copper concentration in soil samples ranged from 2 to 129 mg/kg, with an average 15 mg/kg. A total of 595 bacterial isolates from 45 olive tree agricultural fields were studied. Minimum inhibitory concentrations (MICs) ≥ 16 mM were frequently detected for copper (57% of isolates), zinc (37%) and lead (62%). Only 3% had MICs ≥ 12 mM for nickel. 96 metal-tolerant strains from the 45 soil samples were selected for identification and antibiotic resistance determination. Most isolates belonged to genus *Pseudomonas* (37%), followed by *Bacillus* (23%) and *Chryseobacterium* (20%). 6% were identified as *Variovorax*, 4% as *Stenotrophomonas*, 2% as *Serratia* or *Burkholderia* and *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Janthinobacterium* and *Sphingobacterium* represented 1% of resistant isolates each. Highest copper tolerance was detected among *Pseudomonas*.

Over 75% of the strains with high copper tolerance were also resistant to vancomycin, 50% to ampicillin, and 40% to erythromycin or trimethoprim-sulphamethoxazole.

Evaluation of co-occurrence of metal tolerance and antibiotic resistance genes in bacterial strains from Cu-treated soils and classified as resistant to both type of compounds revealed significant associations between genes involved in copper tolerance and genes coding for beta-lactamases or tetracycline resistance mechanisms. Genes *pcoA*, *pcoD* and *pcoR* from the operon *pcoABCDRSE*, involved in copper regulation also show association with phenotypic resistance to ceftazidime, and *smtA* gene involved in lead resistance revealed significant association with resistance to vancomycin. Significant associations were also found between *cop* genes and resistance to erythromycin, gentamicin, ceftazidime and vancomycin. The presence of the *czcD* gene (regulation of cobalt, cadmium and zinc efflux system) also shows association with resistance to erythromycin, ampicillin, vancomycin and trimethoprim/sulfamethoxazole, and the P-type ATPase *zntA* gene associates with erythromycin, gentamicin, vancomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole and ampicillin resistances.

In conclusion, bacteria from olive soils are tolerant to metals, mainly copper, but also Zn and Pb, and in lower percentages to Cd and Ni, as well as resistant to clinically important antibiotics, which could be a troublesome issue in clinical settings. Co-occurrence of metal tolerance and antibiotic resistance genes together with the significant associations found between both types of genes may provide additional clues for understanding possible roles of metal-tolerance genes in co-selection of antibiotic resistances.

INTRODUCCIÓN

2 - INTRODUCCIÓN

La correlación entre la tolerancia a los metales pesados y la resistencia bacteriana a los antibióticos y otros agentes antimicrobianos es un problema creciente en nuestra sociedad actual. La resistencia a los antibióticos se adquiere por un cambio en la dotación genética de la bacteria, que puede ocurrir por una mutación genética o por la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos entre las bacterias del ambiente (American Academy of Microbiology, 2000). Debido a que los antibióticos disponibles en la actualidad se están volviendo menos efectivos, en parte debido a un uso excesivo, las enfermedades infecciosas son cada vez más difíciles y costosas de tratar. El empleo de los antibióticos en la clínica humana, así como en la agricultura y la ganadería, está contribuyendo al creciente problema de las bacterias resistentes a los antibióticos. Pero no es este el único escenario a tener en cuenta. Productos como desinfectantes, esterilizantes y metales pesados utilizados en la industria, agricultura o en productos para el hogar ejercen, junto con los antibióticos, una presión selectiva en el ambiente que conduce a mutaciones en microorganismos que les permitirán sobrevivir y multiplicarse (Baquero *et al.*, 1998) y que, en muchas ocasiones, presentarán un perfil de multi-resistencia a varios de estos agentes.

Según la discusión de J. Lawrence (2000) sobre la teoría del operón egoísta, la agrupación de genes en un plásmido, si ambos o todos los genes agrupados son útiles para el organismo, es beneficioso para la supervivencia de ese organismo y su especie porque esos genes tienen más probabilidad de ser transferidos juntos en caso de conjugación. Por lo tanto, en un entorno con múltiples agentes de presión selectiva, por

ejemplo, antibióticos y metales pesados, sería más favorable ecológicamente, en términos de supervivencia, que una bacteria adquiriera resistencia a ambos agentes. Si la resistencia es mediada por plásmidos, es más probable que esas bacterias con genes de resistencia agrupados transmitan simultáneamente esos genes a otras bacterias, y esas bacterias tendrían a su vez más posibilidades de sobrevivir. En tal situación, podemos esperar una asociación entre la resistencia a los antibióticos y la tolerancia a metales pesados. Ya en 1984, Calomiris y colaboradores estudiaron bacterias aisladas del agua potable, encontrando un alto porcentaje de bacterias tolerantes a los metales que también eran resistentes a los antibióticos.

En el cultivo del olivar se emplean de forma habitual diversos compuestos derivados del cobre para tratar una de las enfermedades más frecuentes en este tipo de cultivo, el repilo, provocado por el hongo *Spilocaea oleagina*. Si bien actualmente se están desarrollando sustitutos al cobre para el tratamiento de esta enfermedad, debido a la persistencia en el ambiente de este metal y a su fitotoxicidad, hoy por hoy sigue siendo el tratamiento de elección en cultivos tanto tradicionales como de producción ecológica, que supone el empleo de un conjunto de técnicas agrarias que excluye normalmente el uso de productos químicos de síntesis como fertilizantes, plaguicidas, antibióticos, etc., con el objetivo de preservar el medio ambiente, mantener o aumentar la fertilidad del suelo y proporcionar alimentos con todas sus propiedades naturales.

La actual normativa de aplicación permite la realización de tratamientos con sustancias activas que están específicamente permitidas en agricultura ecológica y que vienen recogidas en los anexos correspondientes [Reglamento (CE) nº 889/2008 de la

Comisión, de 5 de septiembre de 2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 834/2007].

Básicamente existen cuatro tipos de compuestos cúpricos en el mercado: sulfatos, oxiclорuros, hidróxidos y óxidos. El reglamento CEE 2092/91 autoriza los siguientes productos cúpricos en agricultura ecológica:

- Sulfato de cobre: Contiene entre un 20 % y un 25 % de cobre metal. Debido a su estructura, es el cobre más persistente, pero también es el más fitotóxico ya que el tamaño de la partícula es muy pequeño y se puede ver arrastrada más fácilmente al interior de las células vegetales. En este grupo encontramos el Caldo Bordoles o sulfato cuprocálcico y los sulfatos tribásicos de cobre.

- Oxiclорuro de cobre: contiene un 50 % de cobre metal, posee poca adherencia y persistencia y, por lo tanto, es menos fitotóxico.

- Óxido cuproso: Es el cobre de color rojo, posee entre 50 y 80 % de cobre metal, una buena eficacia y una alta persistencia. Tiene mayor resistencia al lavado.

- Hidróxido de cobre: con un 50 % de cobre metal, permite una rápida liberación de los iones de cobre, tiene efecto de choque y una buena eficacia, pero una baja persistencia.

No obstante, el abuso de los tratamientos de cobre puede provocar una acumulación excesiva de este elemento en el suelo y esto conlleva una fitotoxicidad con efectos adversos en el cultivo por absorción de las raíces. Por ello, el reglamento de

producción ecológica limita el uso del cobre hasta un máximo de 6 kg de cobre metal por hectárea y año (60 g de cobre metal por 100 m²), desde enero de 2006 (anteriormente el límite estaba establecido en 8 kg). Esto reduce los tratamientos permitidos con un producto cúprico a entre 3 y 5 aplicaciones autorizadas al año.

En la provincia de Jaén la mayoría de cultivos de olivar siguen los métodos tradicionales, frente a un porcentaje creciente de parcelas que aplican la normativa legal vigente para adaptarse a los métodos de cultivo ecológicos. En relación a los derivados de cobre, como se ha descrito, está permitido su empleo en ambos tipos de agricultura si bien en cultivos ecológicos su empleo está limitado por hectárea y año.

Las bacterias tienen una gran capacidad de adaptación a los agentes tóxicos, bien sean metales pesados, antibióticos, u otro tipo de antimicrobianos. En las últimas décadas, las bacterias resistentes a antibióticos han surgido como un grave problema de salud pública debido a la aparición de patógenos resistentes a múltiples antibióticos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* (Walsh, 2011), enterococos resistentes a vancomicina (Moretti *et al.*, 2011) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Tiemersma *et al.*, 2004) y cada vez más evidencias científicas corroboran que la contaminación por metales pesados puede actuar como un agente de presión selectiva persistente, recalcitrante y generalizado, que favorece la proliferación de resistencias a antimicrobianos en ambientes naturales (Icgen y Yilmaz, 2014; Baker-Austin *et al.*, 2006). Este tema es de especial interés considerando que los niveles antropogénicos de metales pesados son en la actualidad varios órdenes de magnitud mayores que los niveles de antibióticos (Stepanauskas *et al.*, 2005). A diferencia de los antibióticos, los

metales no son degradables y en consecuencia pueden representar una presión selectiva a muy largo plazo.

Las investigaciones de resistencias microbianas frente a antibióticos y metales pesados que han sido llevadas a cabo en aislados tanto clínicos como ambientales ponen de manifiesto que ambos tipos de resistencias se encuentran de forma habitual en la misma bacteria (Davis *et al.*, 2005). Es más, en ocasiones la adquisición de la resistencia a antibióticos no depende de la presencia de estos compuestos, sino de una gran variedad de otras sustancias presentes en los ambientes naturales como metales pesados o biocidas (Sidhu *et al.*, 2001; Chapman, 2003). Además, la asociación entre los tipos y niveles de contaminación por metales pesados y los patrones específicos de resistencia a antibióticos sugieren que varios mecanismos son responsables de este proceso de co-selección (Baker-Austin *et al.*, 2006).

La contaminación por metales pesados en aguas o suelos puede ser el responsable potencial del mantenimiento de un reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos en estos ambientes y la interacción de microorganismos asociados al hombre con microorganismos ambientales en ecosistemas naturales como las aguas o suelos puede a su vez provocar un incremento en la incidencia de resistencias a antibióticos en bacterias patógenas, lo que dificulta el manejo de las infecciones asociadas a estos microorganismos. Sin embargo, la mayor parte de los estudios previos disponibles se han realizado en suelo y aguas cercanos a vertidos industriales o en zonas contaminadas con sedimentos residuales (Oyetibo *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2012; Içgen y Yilmaz, 2014). De hecho, los mayores niveles de metales en aguas se asocian a la contaminación industrial más que a los tratamientos agrícolas.

El suelo es una mezcla compleja de componentes minerales y orgánicos, acuosos y gaseosos. Es un sistema dinámico con variaciones en el contenido de humedad, el pH y las condiciones de potencial redox. Estas propiedades interfieren con la forma y la disponibilidad de los metales (Alloway, 1990). Las interacciones entre el suelo y los metales pesados pueden entenderse sobre la base del intercambio iónico, la adsorción en superficie y/o las reacciones de quelación. Las sustancias húmicas tienen la capacidad de formar complejos con metales pesados debido a sus grupos funcionales. La retención de metales pesados por el suelo también depende de la fuerza iónica, el pH, el tipo de minerales arcillosos presentes, el tipo de grupos funcionales y los cationes (Alloway, 1990; Evangelou, 1998). La absorción de metal aumenta al aumentar el pH. Los metales pesados son más móviles en condiciones ácidas y el aumento del pH reduce su biodisponibilidad (Alloway, 1990).

2.1 - Metales pesados

Los metales pesados representan una gran preocupación ambiental debido a su uso y distribución generalizados y particularmente a su toxicidad para los seres humanos y la biosfera. Sin embargo, también estos elementos son esenciales para los organismos vivos a bajas concentraciones (Alloway, 1990). Cann (2005), define como metales pesados a los metales con una densidad superior a $4\text{-}5\text{ g/cm}^3$. Kennish (1991) clasifica como metales pesados a aquellos con un peso molecular entre 63,546 y 200,590 g/mol. De los 90 elementos naturales, 53 tienen la consideración de metales pesados (Weast y Astle, 1984).

Los metales pesados tienen un efecto adverso sobre la fisiología humana y otros sistemas biológicos (Bailey *et al.*, 1999; Kobya *et al.*, 2005). Los iones de cadmio, plomo y mercurio tienen la capacidad de unirse a las membranas celulares, lo que interfiere con los procesos de transporte celular (Bailey *et al.*, 1999; Manahan, 2011). Los metales pesados también pueden estimular la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que pueden llevar a las células al estrés oxidativo (Dietz *et al.*, 1999). No son biodegradables y tienden a acumularse en los tejidos de los organismos vivos, por el proceso denominado bioconcentración (Bailey *et al.*, 1999; Cann, 2005; Kobya *et al.*, 2005).

Los metales pesados son contaminantes de gran persistencia ya que no son degradables. Se utilizan en diversas industrias desde donde son liberados al medio ambiente. La introducción de metales en diversas formas en el medio ambiente puede producir numerosas modificaciones en las comunidades microbianas y afectan a su actividad (Jansen *et al.*, 1994; Hiraki, 1994; Starzecka y Bednarz, 1993). Las fuentes de contaminación por metales pesados incluyen industrias, la fabricación de plásticos, plantas productoras de fertilizantes y desechos de los procesos mineros y metalúrgicos (Zouboulis *et al.*, 2004).

Los metales pesados generalmente ejercen una acción inhibitoria sobre los microorganismos bloqueando grupos funcionales esenciales, desplazando iones metálicos esenciales o modificando las conformaciones activas de las moléculas biológicas (Jansen *et al.*, 1994; Gadd y Griffiths, 1977; Wood y Wang, 1983). Sin embargo, en concentraciones relativamente bajas, algunos iones de metales pesados (por ejemplo, Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+}) son esenciales para los microorganismos ya que

proporcionan cofactores vitales para metaloproteínas y enzimas (Eiland, 1981; Jensen *et al.*, 1994).

Roane y Pepper (2000) clasifican a los metales en tres categorías sobre la base de sus funciones y efectos biológicos:

1. Los metales esenciales con funciones biológicas conocidas: Sodio (Na), Potasio (K), Magnesio (Mg), Calcio (Ca), Vanadio (V), Manganeso (Mn), Hierro (Fe), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Molibdeno (Mo) y Wolframio (W).

2. Los metales tóxicos: Plata (Ag), Cadmio (Cd), Estaño (Sn), Mercurio (Hg), Titanio (Ti), Plomo (Pb), Aluminio (Al) y metaloides: Germanio (Ge), Arsénico (As), Antimonio (Sb), y Selenio (Se).

3. Metales no esenciales, no tóxicos y sin funciones biológicas conocidas: Rubidio (Rb), Cesio (Cs) y Estroncio (Sr). Estos metales algunas veces se encuentran acumulados en las células como resultado del secuestro y transporte no específicos (Gadd, 1988).

Estos cationes poseen una gran variedad de funciones, en términos generales. Están implicados en la estabilización de numerosas estructuras biológicas, desde la pared celular hasta la conformación de proteínas y se estima que alrededor del 50% de las proteínas son metaloproteínas y un tercio de las proteínas estructurales contienen metales en su estructura (Degtyarenko, 2000). Metales como el cobre, níquel, hierro y cobalto son frecuentemente catalizadores de un amplio rango de procesos bioquímicos

y en ciertos casos son capaces de iniciar, moderar o detener reacciones (Cobine *et al.*, 1999).

Algunos de estos metales, incluso los considerados esenciales, son tóxicos para los microorganismos en concentraciones elevadas (Franke *et al.*, 2003). Por tanto, las células deben asegurar sus requerimientos fisiológicos para los metales esenciales y al mismo tiempo prevenir su efecto perjudicial (Adaikkalam y Swarup, 2002). Resulta de gran interés conocer porqué resultan tóxicos y en qué manera pueden generar resistencias, ya que los microorganismos utilizan numerosos mecanismos para mantener este correcto equilibrio (Silver y Phung, 1996).

2.1.1 - Cadmio

El cadmio (Cd) es miembro del grupo II-B de la tabla periódica y es un metal relativamente raro (Alloway, 1990) que lo hace poco común en la mayoría de los suelos y aguas de forma natural (Evangelou, 1998). El contenido promedio de Cd en el suelo es inferior a 1 ppm, con un rango normal de 0,005-0,02 ppm en las plantas (Mulligan *et al.*, 2001). Es muy similar al zinc sometido a procesos geoquímicos conjuntos, y su estado de oxidación es +2 (Manahan, 2011). El Cd se presenta como un subproducto de la extracción y fundición de plomo y zinc (Alloway, 1990; Evangelou, 1998; Cann, 2005). Este metal pesado se utiliza en semiconductores, baterías de níquel-cadmio, galvanoplastia, fabricación de PVC, diversas aleaciones, pigmentos y barras de control

para reactores nucleares (Alloway, 1990; Evangelou, 1998). La contaminación del suelo y del agua por Cd tiene su origen en las industrias de la minería y la fundición, la contaminación atmosférica, de lodos cloacales y la quema de combustibles fósiles (Alloway, 1990; Evangelou, 1998).

El Cd no tiene una función biológica esencial y, por el contrario, es altamente tóxico para los organismos vivos. La acumulación del Cd se lleva a cabo por el mismo mecanismo de transporte que el Magnesio (Nies y Silver, 1989). La exposición crónica al cadmio en humanos tiene varios efectos tóxicos, como hipertensión, daño a nivel renal o pulmonar, en hígado y testículos (Alloway, 1990; Evangelou, 1998; Manahan, 2011; Cann, 2005).

En bacterias Gram positivas, la acumulación de Cd^{2+} conduce a la expresión del sistema *CadA* (Figura 1) (Nies y Silver, 1995), que se encuentra en el plásmido p1258 y plásmidos relacionados (Novick y Roth, 1968; Nies y Silver, 1995). El sistema *CadA* media la tolerancia mediante el transporte activo de iones (Tynecka *et al.*, 1981; Nies y Silver, 1995). El determinante de resistencia de *cadA* es inducible y el producto del gen *cadC* es una proteína de unión al ADN que actúa como regulador de este sistema (Figura 1) (Yoon *et al.*, 1991; Nies y Silver, 1995). El exporte de cationes es catalizado por la proteína CadA, un tipo de P-ATPasa que sirve como fuente de energía para el transporte de cadmio catalizado por la CadA (Oden *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1992; Silver *et al.*, 1989; Tsai y Linet, 1993; Nies y Silver, 1995).

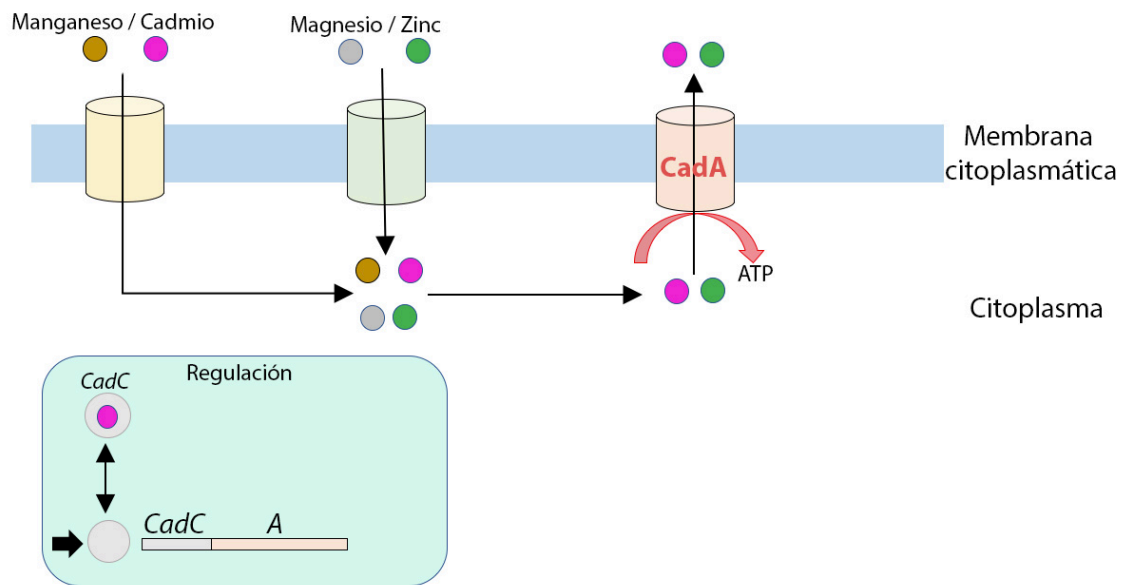


Figura 1. Tolerancia y transporte de Cd y Zn en *Staphylococcus aureus*. Adaptado de Nies y Silver (1995).

En bacterias Gram negativas, el cadmio parece ser eliminado mediante el sistema Czc, que principalmente exporta zinc (Nies y Silver 1995; Nies, 1999) y Ncc, que es principalmente un exportador de níquel (Schmidt y Schlegel, 1994). Las cianobacterias, sin embargo, contienen proteínas de tipo metalotioneína (smt) (Olafson *et al.*, 1979; Nies, 1999) (figura 2d). También se ha encontrado que la amplificación del locus de metalotioneína *smt* aumenta la tolerancia a cadmio y la eliminación de *smt* disminuye la tolerancia (Gupta *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1995; Nies, 1999).

Las metalotioneínas se unen a metales pesados, contienen un grupo tiol y son ricas en cisteína. Estas proteínas secuestran metales impidiendo así la acumulación de iones metálicos libres dentro de la célula (Zhou y Goldborough, 1994; Ybarra y Webb, 1998; Andrews, 2000). La unión de iones de metales pesados se produce a través de las interacciones de los iones con los grupos tiol de los residuos de la cisteína. Los genes de

la metalotioneína se encuentran como un operón llamado locus *smt*, que contienen tanto *smtA* (que codifica la proteína metalotioneína) como *smtB* (que codifica los genes represores) (Ybarra y Webb, 1998). La expresión de la metalotioneína, desde el gen hasta la proteína funcional, es inducida por los iones de metales pesados, y la regulación de la transcripción a ARNm es dependiente de la interacción entre estos iones de metales pesados y el represor de transcripción, nuevamente a través de la interacción con los grupos tiol presente en la proteína represora (Erbe *et al.*, 1995; Ybarra y Webb, 1998).

2.1.2 - Cobre

El cobre (Cu), es el primer elemento del grupo I-b de la tabla periódica de los elementos. Ocupa el puesto 26 en abundancia en la litosfera. Su abundancia promedio en la corteza terrestre es de 60 mg Cu/kg y su concentración en el suelo puede variar entre 2 y 50 mg/kg (Alloway, 1990; Lide, 2012). Es un metal de transición y, por lo tanto, tiene más de un estado de oxidación. Las formas principales son cuprosa (Cu^{+1}) y cúprica (Cu^{+2}). La forma trivalente (Cu^{+3}) existe, pero es relativamente poco importante en los sistemas fisiológicos y biológicos. En su estado cuproso es inestable en medio acuoso y precipita. Sin embargo, los cationes de Cu monovalentes son sólo susceptibles a dicha transformación cuando no están químicamente unidos a compuestos insolubles o estabilizando formas complejas (Alloway, 1990).

Los productos de agricultura son responsables de la mayor parte del contenido en Cu en suelos agrícolas. Tanto el contenido de Cu como la tasa de aplicación varían ampliamente en los diferentes productos. Las principales fuentes de entrada de Cu a los suelos agrícolas son el estiércol, las aguas residuales, fertilizantes minerales y pesticidas. El cobre aparece en el estiércol a través de la alimentación de los animales y la administración de cobre como antibiótico (Van Sprang *et al.*, 2005).

Los fungicidas a base de cobre ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca(OH)}_2$, Cu(OH)_2 , Cu_2O , etc.) se han utilizado intensamente desde finales del siglo XIX hasta la actualidad para controlar las enfermedades fúngicas de la vid, como la causada por *Plasmopara viticola* o en el cultivo de olivo para el tratamiento contra el hongo *Spilocaea oleagina*. Además de los viñedos, los fungicidas a base de Cu también se han utilizado ampliamente en los campos de lúpulo, huertos de café, manzana y aguacate (Epstein y Bassein, 2001) y para el cultivo de varios vegetales (por ejemplo, tomates y patatas). Los fungicidas a base de cobre son incluso indispensables para la vid orgánica y el cultivo de frutas. Las tasas de aplicación más habituales varían de 2 a 4 kg de Cu por hectárea y por año y su aplicación a largo plazo y posterior lavado en las plantas han provocado concentraciones elevadas de Cu en algunos suelos de viñedos y olivares (Komárek *et al.*, 2010; Michaud *et al.*, 2007; Valladares *et al.*, 2009).

El cobre es un oligoelemento esencial vital para la salud de todos los organismos vivos (humanos, plantas, animales y microorganismos). Se encuentra en una variedad de enzimas y proteínas, incluida la citocromo C oxidasa, la cobre-zinc superoxidasa dimutasa y la amino oxidasa (Malakul *et al.*, 1998; Gort *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 1992.),

pero es altamente tóxico cuando está presente en exceso (Lu *et al.*, 1999; Iwata *et al.*, 1995).

La homeostasis del Cu se ha descrito en microorganismos modelo tipo *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae*, *Enterococcus hirae* y *Saccharomyces cerevisiae* (Brown *et al.*, 1992; Cooksey 1993; Cooksey 1994; Zhou y Thiele 2001).

Los iones de cobre posiblemente se acumulen mediante el transportador CorA-Mg²⁺ y adicionalmente por las P-ATPasas (Figura 2). Los mecanismos para el metabolismo del cobre ocurren naturalmente en todos los organismos vivos, y generalmente están codificados cromosómicamente (Liu *et al.*, 2002). A diferencia de los mecanismos que modulan la resistencia al cobre en otros organismos, en las bacterias a menudo se codifican por medio de plásmidos (Cooksey, 1993). Estos plásmidos y los sistemas cromosómicos pueden interactuar entre sí para mantener la homeostasis del cobre en bacterias (Rogers *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995).

Dentro las células, el cobre puede estar unido a diversos compuestos formando complejos (Nies, 1999). Las ATPasas de tipo P parecen desintoxicar el cobre a través del exporte en algunas especies, sin embargo, los sistemas de resistencia al cobre de *Pseudomonas* se codifican generalmente por cuatro proteínas (Figura 2b. Círculos a, b, c, d), que se unen al cobre en el periplasma o cerca de la membrana externa (Nies, 1999). Si bien los determinantes de resistencia a cobre en *E. coli* y *Pseudomonas*, parecen ser homólogos, el fenotipo de ambas es distinto. Mientras *E. coli* presenta un crecimiento incoloro, *Pseudomonas* aparece de un color azulado debido a la acumulación de cobre

en el periplasma y la membrana externa (Cooksey 1993; Cooksey 1994). Tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas* los mecanismos de tolerancia al cobre están mediados por un sistema regulador de dos componentes formado por una histidina quinasa unida a la membrana y un regulador de respuesta soluble que es fosforilado por una quinasa y activa la transcripción de los genes *cop* (Mills *et al.*, 1993; Mills *et al.*, 1994; Rouch y Brown 1997).

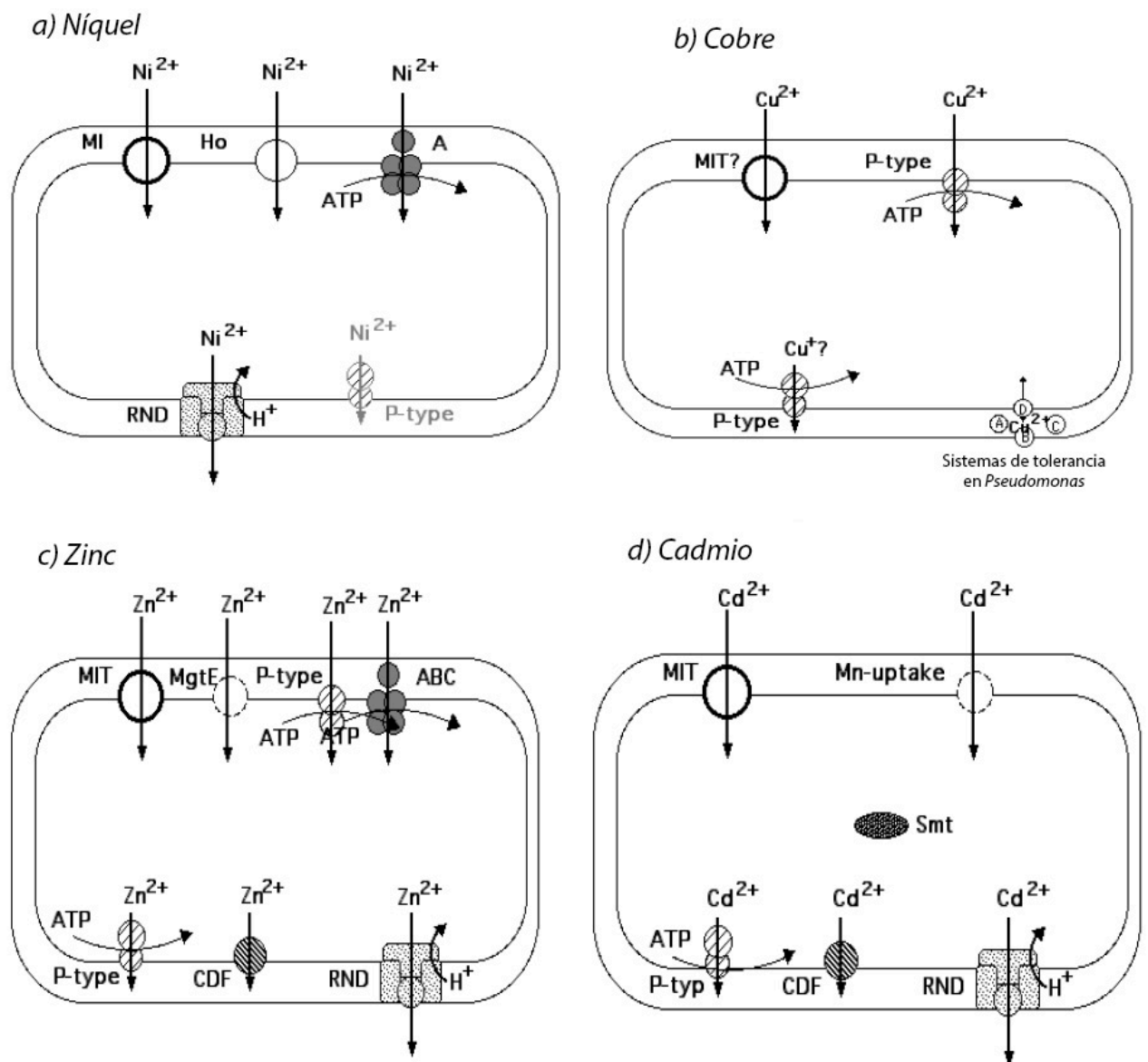


Figura 2. Familias de proteínas involucradas en el transporte y detoxificación de iones de metales divalentes. Adaptado de Nies (1999).

2.1.3 - Níquel

El níquel (Ni) se coloca entre el cobalto (Co) y el cobre (Cu) en el grupo 10 de la tabla periódica, el llamado grupo de metales "hierro-cobalto-níquel". Normalmente, los estados de oxidación de Ni son 0 o +2, aunque los estados +1 y +3 pueden existir bajo ciertas condiciones. La especie inorgánica dominante es Ni (II) en todo el rango de pH y potencial redox de la mayoría de las aguas naturales ya que pierde fácilmente dos electrones y, en cualquier caso, los iones Ni (I) y Ni (III) no son estables en solución acuosa (Adriano, 2001).

El Ni juega un papel primordial en procesos biológicos, que relaciona y explica la química industrial de este metal. De hecho, algunos procesos industriales, tales como hidrogenación, desulfuración y carbonilación se basan en algunas propiedades químicas del Ni, al igual que las correspondientes enzimas dependientes del Ni, es decir, hidrogenasa, monóxido de carbono deshidrogenasa y metil-coenzima M reductasa (Nieminen, 2007). Por lo tanto, el Ni es bien conocido como un oligoelemento esencial para las plantas y las cianobacterias (Muysen *et al.*, 2004; Welch y Shuman, 1995). Además, el Ni se puede considerar como un "catalizador de la vida temprana" (Küpper y Kroneck, 2007). De hecho, el entorno en el que comenzó la vida fue muy probablemente rico en electrones y gases, como el H₂ y el CO₂, y en sulfuros metálicos (Russell y Martin, 2004; Saito *et al.*, 2003). Por lo tanto, se necesitaban catalizadores especiales para manejar estos gases, por lo que este elemento se empleó en funciones bioquímicas en formas de vida temprana (Nriagu, 2003).

Mientras que el Ni es esencial en ciertas bacterias, plantas y animales, su necesidad para los humanos todavía no está bien definida, mientras que la toxicidad y carcinogenicidad de altas dosis de Ni sí están bien documentadas y dependen principalmente de su potencial para dañar proteínas y ácidos nucleicos (Kasprzak y Salnikow, 2007). El níquel se acumula a través del sistema de transporte rápido e inespecífico CorA (sistema de transporte de metal, MIT) en bacterias y en *Saccharomyces cerevisiae* (Hmiel *et al.*, 1989). Los transportadores de níquel altamente específicos son transportadores quimiosmóticos HoxN o transportadores de captación tipo cassette de unión a ATP, que usan una proteína periplásmica de unión al níquel y desintoxica por secuestro y/o transporte (Nies, 1999). La resistencia al níquel más descrita en bacterias, se basa en el flujo de salida de níquel impulsado por el transportador RND (Figura 2a). Se han descrito dos sistemas, uno de resistencia al níquel/cobalto (Cnr) (Liesegang *et al.*, 1993; Nies, 1999) y uno de resistencia al níquel/cobalto/cadmio (Ncc) (Schmidt y Schlegel, 1994; Nies, 1999). Ambos están estrechamente relacionados con el sistema de resistencia de cobalto/zinc/cadmio (Czc) descrito en la cepa CH34 de *Ralstonia* sp. (Nies, 1999).

2.1.4 - Plomo

La abundancia de plomo (Pb) en la corteza continental es de 14.8 mg kg^{-1} (Wedepohl, 1995). El plomo en los suelos existe predominantemente en el estado de oxidación +2. En suelos reducidos aparece principalmente como PbS insoluble precipitado por sulfuro procedente de la reducción de sulfato. Bajo condiciones oxidantes existe como ion Pb^{+2} , pero se vuelve menos soluble al aumentar el pH en la

solución del suelo debido a la formación de complejos con materia orgánica, o a la precipitación en forma de carbonato, sulfato o fosfato. En suelos alcalinos, la solubilidad puede aumentar debido a la formación de complejos solubles Pb-orgánicos (McBride, 1994).

Se cree que el plomo es el primer metal extraído por el hombre, y se utilizó ampliamente durante la antigüedad como base de una gran variedad de objetos y propósitos (Nriagu, 1978; Nriagu, 1983). En las últimas décadas, el uso principal del Pb ha sido en la producción de compuestos alquilplomo para agentes antidetonantes en la gasolina, como pigmentos en pinturas y en baterías de automóviles. Por lo que se sabe, el Pb no es esencial ni beneficioso para ningún organismo vivo (Nies, 1999). Los diversos usos del Pb y sus compuestos también han provocado una exposición considerable de grandes grupos de población durante los últimos tiempos. Las preocupaciones sobre la toxicidad del metal han llevado a una disminución significativa en la aplicación del metal en los últimos años (Oliver, 1997).

Se han descrito MICs para plomo de hasta 4,8 mM, en microorganismos aislados del suelo (Zhang *et al.*, 2012). Para mantener la homeostasis de los metales pesados, los niveles intracelulares de los iones de metales pesados tóxicos tienen que estar controlados (Nies, 1999). Las ATPasas tipo P_{1B} transportadoras de metales, son un grupo de proteínas involucradas en el transporte de metales pesados fuera de la membrana celular y que median la resistencia a metales pesados en bacterias (Figura 3) (Nies y Silver, 1995; Rensing *et al.*, 1999). Estas proteínas transportadoras evitan la sobreacumulación de iones metálicos altamente tóxicos y reactivos tales como Pb (II), Cu (I), Ag (I), Zn (II) y Cd (II). Las ATPasas tipo P_{1B} se pueden dividir en dos subgrupos: (i)

ATPasas de transferencia Cu(I)/Ag(I) codificadas por el gen *copA* en *E. hirae*, *Helicobacter pylori* y *E. coli*; y (ii) ATPasas de transferencia de Zn (II) / Cd (II) / Pb (II) codificadas por el gen *zntA* en *E. coli* y gen *cadA* en el plásmido pI258 de *S. aureus* (Nies y Silver, 1995; Rensing *et al.*, 1997).

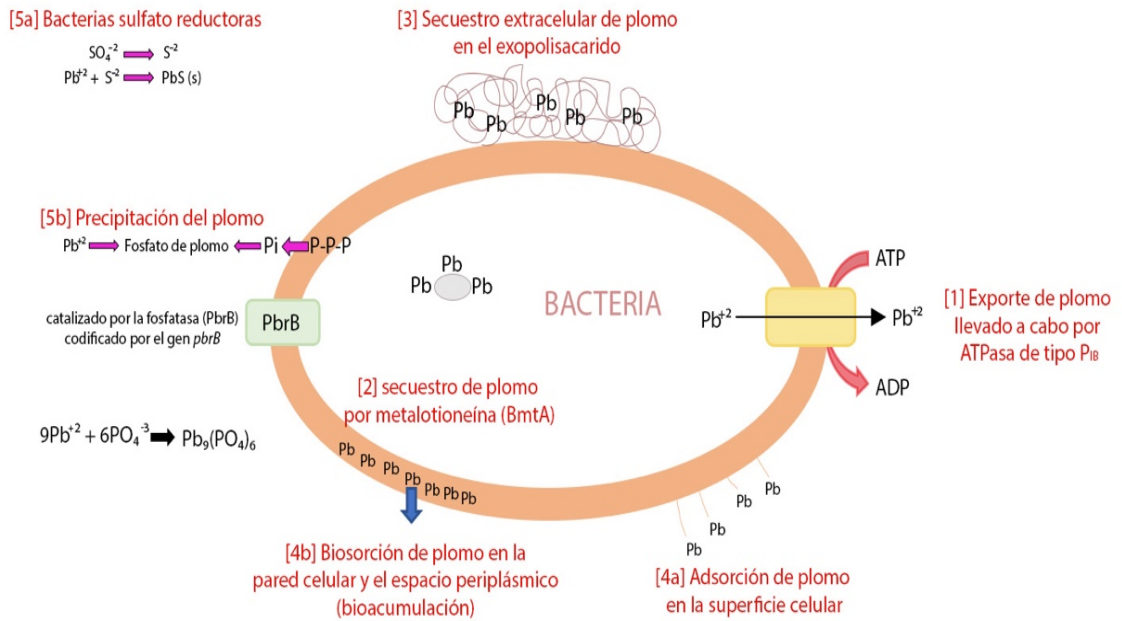


Figura 3. Mecanismos operacionales de tolerancia al plomo en bacterias, (1) Exporte de plomo llevado a cabo por ATPasa de tipo P_{1B}, (2) secuestro de plomo por metalotioneína (BmtA), (3) secuestro de plomo en exopolisacárido, (4a) Adsorción de plomo en la superficie celular, (4b) Biosorción de plomo en la pared celular y el espacio periplásmico (bioacumulación), (5a) Precipitación del plomo por bacterias sulfato reductoras (5b) Precipitación del plomo catalizada por la enzima fosfatasa (PbrB). Adaptado de Naik (2013).

2.1.5 - Zinc

El zinc (Zn) es parte del grupo II-B de la tabla periódica y es relativamente abundante. Es un metal lustroso de color blanco azulado, muy maleable y moderadamente reactivo que se combina con el oxígeno y otros elementos no metálicos. El estado de oxidación común del zinc es Zn^{+2} (Alloway, 1990; Evangelou, 1998). El Zn se utiliza ampliamente en recubrimientos de acero resistentes a la corrosión, aleaciones de latón, pigmentos de pintura, conservantes de madera, baterías de células secas, cosméticos y productos farmacéuticos (Evangelou, 1998; Manahan, 2004). La industria también utiliza una gran cantidad de Zn en el proceso de fundición a presión, que contribuyen a las emisiones a la atmósfera, el agua y el suelo (Harrison, 2001). Las principales fuentes de contaminación de Zn en el medio ambiente son los desechos industriales, la metalización y el drenaje ácido de las minas (Evangelou, 1998). Las aguas residuales y los desechos animales constituyen una fuente de zinc en los suelos. Esto no es muy significativo, pero se sabe que los suelos tienen la capacidad de acumular altas concentraciones de este metal (Alloway, 1990).

Es uno de los elementos traza esenciales y no es biológicamente redox-reactivo y, por lo tanto, no se usa en la respiración (Spain y Alm, 2003). El zinc puede formar complejos con varios componentes celulares (Daniels *et al.*, 1998; Palmiter, 1998; Nies, 1999). Es componente de una amplia variedad de enzimas y proteínas de unión a ácidos nucleicos (Chou *et al.*, 1998; Nies, 1999). La absorción del Zn^{+2} es inespecífica y rápida, está mediada por el sistema de transporte Mg^{+2} CorA (MIT) en algunas especies bacterianas y por el sistema de MgtE inespecífico en otros (Figura 2c). Hay dos sistemas

para la detoxificación del zinc en bacterias; las ATPasas de tipo P, que transportan solo zinc a través de la membrana citoplásmica, y transportadores impulsados por RND (transporte de zinc a través de la pared celular completa de bacterias Gram negativas (Figura 2c).

En *E. coli*, las P-ATPasas de tipo ZntA pueden ser responsables del exporte de zinc (Beard *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1997; Nies, 1999) y el transportador ZiaA se ha descrito en la cianobacteria *Synechosystis* (Thelwell *et al.*, 1998; Nies, 1999). Por otra parte, ATPasas de tipo P median el exporte de cadmio y zinc en la mayoría de los casos (Nies, 1999). En *S. aureus* es catalizado por transportadores facilitadores de la difusión de cationes (CDF), que también median la resistencia al cobalto (Xiong y Jayaswal, 1998).

2.1.6 - Tolerancia y toxicidad de los metales pesados

Concentraciones bajas de ciertos metales como el zinc, el cobre, el cobalto y el níquel son esenciales para la actividad metabólica de las células bacterianas y juegan un papel indispensable en el crecimiento celular y el mantenimiento de las funciones metabólicas, pero pueden llegar a ser perjudiciales en altas concentraciones (Badar *et al.*, 2000). Otros metales como el plomo, cadmio, mercurio y cromo no tienen efectos conocidos sobre la actividad celular y son citotóxicos (Chen *et al.*, 2005a, 2005b; Abou-Shanab *et al.*, 2007).

Nies (1999) señala que, de los 17 metales pesados más comunes, se pueden clasificar al hierro, manganeso y molibdeno como de baja toxicidad, al zinc, níquel, cobre, cobalto, cromo, vanadio y wolframio con una toxicidad media, y metales como el cadmio, mercurio, plomo, arsénico, plata, antimonio y uranio como elementos con alta toxicidad. Un amplio rango de componentes celulares son posibles sitios de unión para los metales pesados pudiendo causar daño en el ADN y llevar a la muerte celular (Malakul *et al.*, 1998). Mientras que otros metales como el hierro, cobre y níquel son elementos esenciales ya que son componentes estructurales, tienen función catalítica o son componentes de enzimas (Cobine *et al.*, 1999).

Las estructuras de superficie de las bacterias son de extrema importancia para comprender sus interacciones con el medio ambiente, especialmente con los metales. Las paredes celulares Gram negativas son una estructura multicapa con una membrana externa que contiene lipopolisacáridos, fosfolípidos y una pequeña capa de peptidoglicano. Por otro lado, las células Gram positivas tienen hasta un 90% de la pared celular que se compone de peptidoglicano en varias capas, con pequeñas cantidades de ácido teicoico (Madigan *et al.*, 2008; Guiné *et al.*, 2007). Estas estructuras tienen carga negativa y pueden interactuar con los iones metálicos (Guiné *et al.*, 2007).

Varios microorganismos muestran una respuesta diferente a los iones de metales pesados tóxicos que les confieren un rango de tolerancia al metal (Valls y de Lorenzo, 2002). Las bacterias pueden lograr esto de diferentes maneras, ya sea a través de mecanismos biológicos, físicos o químicos que incluyen precipitación, formación de complejos, adsorción, transporte, excreción o presencia de pigmentos, polisacáridos, enzimas y proteínas específicas de unión a metales (Marazioti, 1998; Hetzer *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista metabólico, un grupo de proteínas quelantes de metales llamadas metalotioneínas, juegan un papel muy importante en la tolerancia a metales (Marazioti 1998; Valls y de Lorenzo, 2002). Las metalotioneínas son pequeños polipéptidos ricos en cisteína que pueden unir metales tanto esenciales (por ejemplo, Zn) como no esenciales (por ejemplo, metales pesados) (Marazioti, 1998).

Otros mecanismos de resistencia incluyen el transporte activo, la formación de complejos, la reducción y el secuestro de los iones de metales pesados a un estado menos tóxico (Nies, 1999). Estos mecanismos de tolerancia generalmente están regidos por plásmidos, lo que contribuye enormemente a la dispersión de estos mecanismos de tolerancia de célula a célula (Collard *et al.*, 1994; Valls y de Lorenzo, 2002); en algunas especies bacterianas la resistencia cromosómica también se relaciona con estos mecanismos (Spain y Alm, 2003; Abou-Shanab *et al.*, 2007).

2.2 - Mecanismos de resistencia

Las bacterias son una de las formas más primitivas de vida en la Tierra, y han desarrollado una amplia tolerancia a metales pesados en su genoma y poseen diversos y variados mecanismos para adquirir resistencia o tolerancia a iones metálicos (Silver y Walderhaug, 1992; Silver, 1996). Sin embargo, estos mecanismos de defensa no ofrecen protección frente a concentraciones elevadas de estos iones metálicos observándose un efecto tóxico letal para la célula (Malakul 1998). Se pueden mencionar cuatro mecanismos de tolerancia básicos: Unión en superficie o reducción en la captación

(Laddaga *et al.*, 1985), aumento en el exporte (Nies, 1992a), secuestro intracelular (Diels *et al.*, 1995) y modificación del ion metálico a una forma menos tóxica (Summers, 1986). Estos mecanismos pueden actuar de forma individual o bien combinados (Gadd, 1992).

2.2.1 - Unión y transporte de iones metálicos

La acumulación intracelular de metales generalmente comprende una unión rápida y reversible del metal a la superficie celular y su consecuente transporte al interior de la célula a través de la membrana. Por el contrario, el transporte inverso de los metales juega un papel esencial en los procesos de detoxificación. Beveridge y Murray (1976), observaron la unión de varios metales (Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Na^{+} y K^{+}) en la pared celular de *Bacillus subtilis*, sin embargo, solo unos pocos (Hg^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} y Ag^{+}) se mantuvieron en concentración suficiente para ser detectados. La mayoría de los metales que tenían números atómicos mayores que 11 y que podían detectarse mediante microscopía electrónica parecían manchar de manera difusa secciones delgadas de la pared.

Las bacterias Gram negativas, como *E. coli*, poseen una menor carga en su pared celular, pero mediante su estructura externa también se ligan a iones metálicos como Pb^{2+} o Hg^{+} . Generalmente éstas poseen mayor tolerancia a metales pesados que las bacterias Gram positivas (Beveridge y Koval, 1981).

La formación de un complejo entre un metal y la capa más externa de la pared celular, en particular con un polímero extracelular o periférico, es un medio importante de eliminación de metales. Sterritt y Lester (1980), demostraron la unión de metales con

polímeros en *Klebsiella aerogenes* y *Pseudomonas* spp. Fenómenos de unión similares con los constituyentes de la pared son evidentes en microbios eucariotas, el metal unido a veces alcanza una proporción sustancial del peso de la pared. El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de cloruro de mercurio, por ejemplo, da como resultado una extensa acumulación del metal a la pared (Murray y Kidby, 1975). Subramanyam *et al.* (1983), cultivaron *Neurospora crassa* en presencia de altas concentraciones de cobre, como resultado su pared celular se volvió azul y contenía un 12% de cobre en su peso; el hierro y el zinc también presentaron el mismo efecto, probablemente unidos al quitosan.

2.2.2 - Mecanismos de exporte

En bacterias las bombas de exporte son la base de la mayoría de los sistemas de resistencia a iones metálicos tóxicos, involucrando transportadores tales como ATPasas de tipo P o antiportadores catión/H⁺ (Silver y Phung, 1996; Silver, 1996); se han identificado varios sistemas de bombas de exporte para Cu, Cd, Zn, Co, y Ni (Silver *et al.*, 1989). Las bombas de exporte reducen la concentración intracelular de metales por medio de sistemas de transporte, sin ninguna transformación enzimática (Nies, 1999). Estos mecanismos están más extendidos que la detoxificación enzimática.

2.2.3 - Mecanismos de captación

A altas concentraciones, los iones de metales pesados actúan como compuestos tóxicos para las células (Nies, 1999). Para tener un efecto tóxico, sin embargo, los iones

de metales pesados deben entrar primero a la célula. Debido a que algunos metales pesados son necesarios para las funciones enzimáticas y el crecimiento bacteriano, existen mecanismos de captación que permiten la entrada de iones metálicos en la célula. Existen dos sistemas generales, uno es rápido e inespecífico, impulsado por un gradiente quimiosmótico a través de la membrana celular y, por lo tanto, no requiere ATP. El otro es más lento y más específico, impulsado por la energía de la hidrólisis del ATP. Mientras que el primer mecanismo es más eficiente en energía, da como resultado el flujo de una variedad más amplia de metales pesados, y si estos metales están presentes en altas concentraciones, es más probable que provoquen un efecto tóxico una vez dentro de la célula (Nies y Silver, 1995).

El Ni^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , y Mn^{+2} son transportados en bacterias Gram negativas por el sistema de captación de magnesio inespecífico CorA (Smith y Maguire, 1995). Resulta difícil controlar el transporte de altas concentraciones de metales pesados al citoplasma porque el transportador por captación se expresa de manera constitutiva, por lo que se comporta como una puerta que no se puede cerrar (Tao *et al.*, 1995).

2.2.4 - Biotransformación de metales

La metilación de metales inorgánicos es un fenómeno biogeoquímico importante y bien conocido en los sistemas naturales y en la biosfera, y para el cual existe evidencia de transformaciones bioquímicas y moleculares (Summers y Silver, 1978). La transformación de metales y compuestos metálicos por los microorganismos puede dividirse en dos categorías: la reducción u oxidación de su forma inorgánica y la

conversión de su forma inorgánica a orgánica y viceversa, mediante un proceso denominado metilación y desmetilación (Summers y Silver, 1978).

2.2.5 - Resistencia determinada por componentes genéticos

La mayoría de los mecanismos de tolerancia a metales pesados, así como la resistencia a antibióticos están determinados por plásmidos. Los transposones son elementos móviles que pueden recombinar una molécula de ADN en otra, y con los plásmidos, permiten el rápido movimiento de genes de resistencia entre células de una población bacteriana. Así mismo facilitan el estudio de los mecanismos de resistencia mediante técnicas moleculares (Foster, 1987).

2.2.6 - Homeostasis de Cobre

En *E. coli* se han descrito múltiples sistemas para la regulación de las concentraciones de cobre (Rensing y Grass, 2003). Un componente central en la homeostasis del cobre de *E. coli* es la membrana interna que transporta el cobre a través de la ATPasa de tipo P CopA, que asegura la eliminación del exceso de Cu (I) del citoplasma. En el espacio periplásmico, tanto la oxidasa CueO como el sistema de flujo de cobre CusCFBA son responsables del control de los niveles de cobre. Además, varias cepas de *E. coli* albergan genes codificados por plásmidos que aumentan considerablemente la tolerancia al cobre, permitiendo el crecimiento en ambientes ricos en cobre (Duncan *et al.*, 1985).

La ATPasa transportadora de cobre CopA es el elemento central de la homeostasis del cobre en *E. coli* tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Rensing y Grass, 2003) y su expresión está regulada por CueR, un activador de la transcripción inducido por Cu (I) y Ag (I) (Outten *et al.*, 2000; Petersen y Moller 2000; Stoyanov *et al.*, 2001). Esta enzima es una proteína de membrana interna integral con ocho α -hélices hidropáticas y funciones y características similares a otras ATPasas tipo P (Figura 4) (Solioz y Vulpe, 1996). El extremo N citoplásmico alberga dos sitios de unión CxxC, sin embargo, estos sitios de unión no son necesarios para la función (Fan *et al.*, 2001) y aparentemente no confieren especificidad de metal (Rensing y Grass, 2003). Se ha visto que la $\Delta copA$ presente en *E. coli* que tiene un gen *copA* alterado es menos resistente al cobre que el tipo salvaje, y la complementación con el gen en un plásmido restaura la tolerancia al cobre (Rensing *et al.*, 2000). Además, también se demostró que la CopA es capaz para transportar plata (Stoyanov *et al.*, 2003).

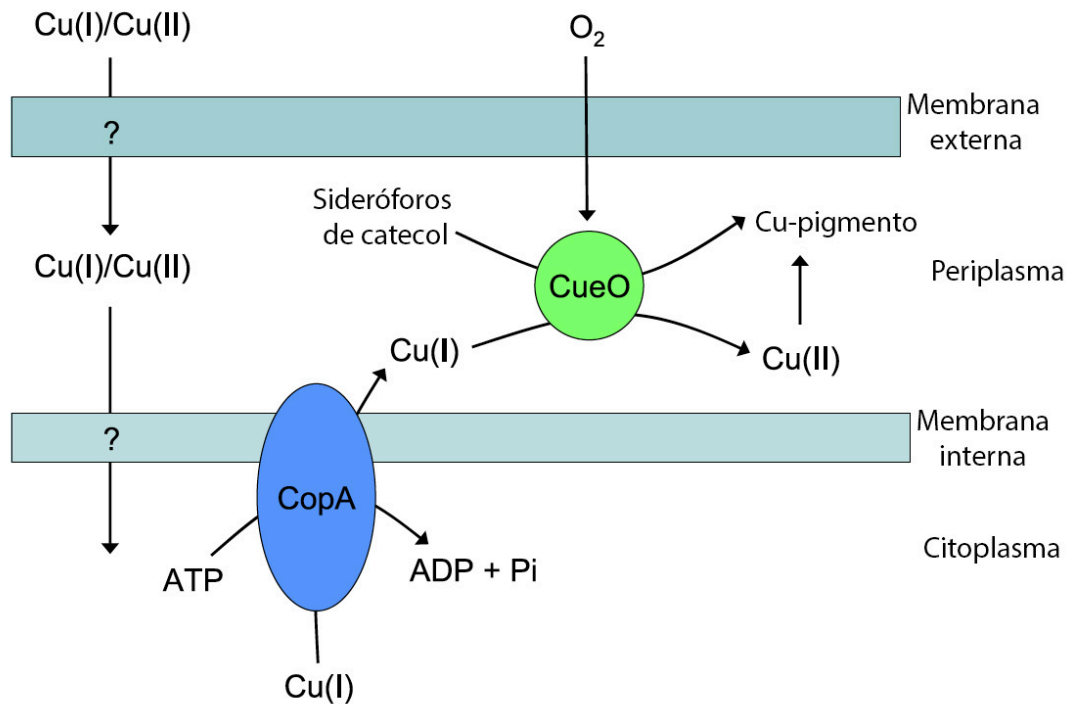


Figura 4. CopA ATPasa y CueO oxidasa de *E. coli*. CopA es una bomba de cobre impulsada por ATP que expulsa Cu(I) del citoplasma al espacio periplásmico. Allí puede oxidarse por la multicobre-oxidasa CueO. Esta enzima también puede oxidar sideróforos de catecol y los pigmentos resultantes pueden secuestrar cobre. Adaptado de Rensing y Grass (2003).

El sistema CueR (cooper export regulator) pertenece a los activadores de transcripción del tipo MerR con una región N-terminal de unión al ADN, una región de unión al cobre y un dominio de dimerización. La expresión de los genes *copA* y *cueO* están ambos regulados por el sistema CueR, pero estos genes no están dentro de un operón (Brown *et al.*, 2003). Este sistema también se activa con la plata y, curiosamente, con el oro (Stoyanov *et al.*, 2003; Stoyanov y Brown, 2003). La base de la altísima sensibilidad de este regulador fue investigada por análisis estructurales determinando que la sensibilidad del CueR para liberar Cu(I) era de 10^{-21} molar (zeptomolar), lo que corresponde a menos de un ion de cobre por célula (Rae *et al.*, 1999). La estructura del

cristal de rayos-X reveló que el ion de cobre estaba enterrado en un sitio inaccesible dentro de un bucle en la interfaz del dímero y tiene sólo dos ligandos de coordinación: los átomos de sulfuro Cys-112 y Cys-120. La mutación de estos dos residuos hace que CueR no responda al cobre, la plata y el oro, lo que subraya la importancia de estos dos residuos (Stoyanov *et al.*, 2001).

CueO es una oxidasa multi-cobre involucrada en la detoxificación del cobre. La expresión del gen *cueO* (copper efflux oxidase) está regulada por el sistema CueR y junto con el gen *copA* constituyen el sistema Cue. Se ha demostrado que la región del promotor *cueO* comparte las mismas características que el promotor *copA* (Outten *et al.*, 2000). Grass y Rensing (2001), describen que la inactivación de *cueO* es responsable de que las células sean más sensibles al cobre, lo que respalda la suposición de que CueO está involucrado en la homeostasis del cobre.

La CueO tiene actividad fenol oxidasa y ferroxidasa. También existe evidencia de que CueO cataliza la oxidación de la enterobactina en presencia de cobre. Grass *et al.*, (2004) demostraron que una mezcla de cobre y enterobactina puede ser muy tóxica y conducir a la muerte celular de *E. coli* en presencia de cobre. La adición de CueO purificado tuvo un efecto positivo en la supervivencia celular. La enterobactina oxidada también puede secuestrar cobre, lo que contribuye al mecanismo de detoxificación. CueO también parece oxidar al cobre, pero la actividad depende del oxígeno, por lo que CueO solo funciona en condiciones aeróbicas (Singh *et al.*, 2004). Por lo tanto, *E. coli* utiliza otro sistema homeostático para el cobre, el operón *cusCFBA*, que hace que las células sean más resistentes al cobre en condiciones anaeróbicas (Outten *et al.*, 2001).

Se ha descrito que la NADH deshidrogenasa-2 (NDH-2) de la cadena respiratoria de *E. coli* también posee actividad cúprico-reductasa. Las cepas deficientes en NDH-2 mostraron ser más sensibles a la presencia de cobre que las células de tipo salvaje. Esto sugiere que NDH-2 ayuda a disminuir los efectos dañinos del cobre y/o estrés oxidativo en la cadena respiratoria y contribuye a la desintoxicación del cobre en *E. coli* (Rodríguez-Montelongo *et al.*, 2006).

Uno de los primeros sistemas bacterianos de tolerancia al cobre transmitido por plásmidos que se estudió en detalle fue identificado en *P. syringae*. El sistema fue descubierto en bacterias resistentes al cobre aisladas de cultivos de tomate en el sur de California que habían sido rociadas con sulfato de cobre para el control de enfermedades (Mellano y Cooksey, 1988). La tolerancia al cobre de estas bacterias está regulada por el operón *copABCDRS* en el plásmido pPT23D. Es homólogo al sistema Pco en el plásmido pRJ1004 de *E. coli* que se aisló de una cepa de la microbiota intestinal de cerdos alimentados con una dieta enriquecida con cobre para promover el crecimiento (Tetaz y Luke, 1983). Clústers de genes similares al operón *pcoABCDRS* (y al *cop* de *P. syringae*) se pueden identificar en los genomas de muchas bacterias. A menudo, sólo los homólogos de PcoA y PcoB están codificados en el genoma, lo que sugiere que CopCD es un sistema accesorio requerido para un nivel de tolerancia máxima. La función del sistema *pco* de *E. coli* en la mayoría de las partes también se aplica al sistema *copABCDRS* de *P. syringae* y a los operones relacionados de otras bacterias) (Figura 5). El cluster *pco* del plásmido pPT23D de *E. coli* contiene, además del operón *pcoABCDRS* presente en muchos organismos, el gen *pcoE*, que se transcribe a partir de su propio promotor (Brown *et al.*, 1995; Cooksey, 1994; Rouch y Brown, 1997). La PcoE es una pequeña

proteína periplásmica que se requiere para la tolerancia total al cobre. Está relacionado con SILE, que es una proteína de unión a plata del sistema plasmídico de resistencia a la plata *Sil* (Gupta *et al.*, 1999). PcoE puede unirse al cobre y la expresión de PcoE por sí misma conduce a la acumulación de cobre en el periplasma (Rensing y Grass 2003).

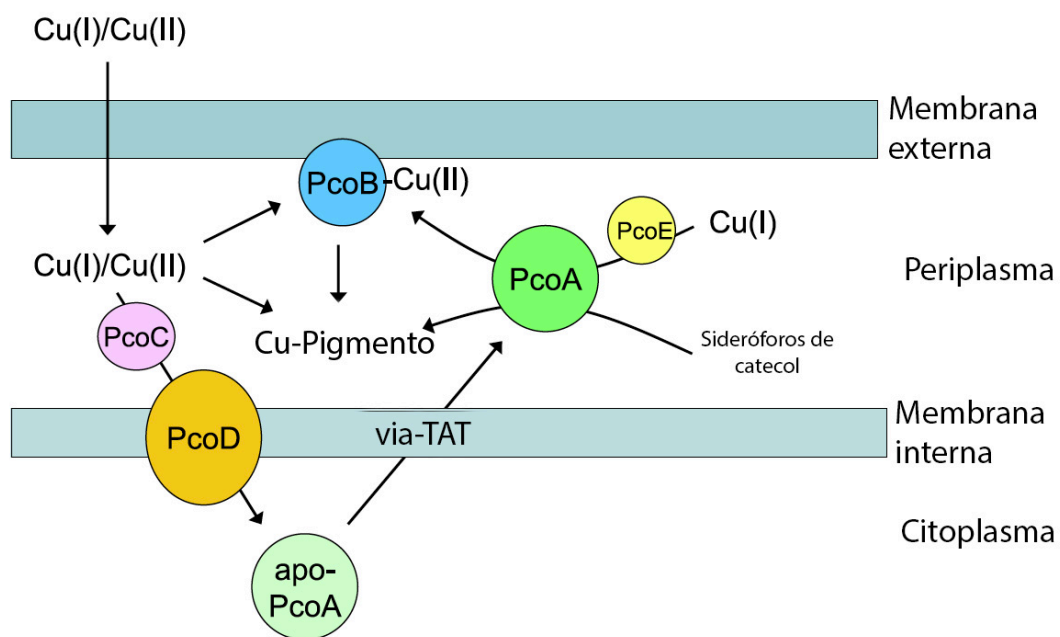


Figura 5. Sistemas Pco/Cop de *E. coli* y *P. syringae*. El cobre ingresa al espacio periplásmico por una vía desconocida. En el periplasma, PcoC transporta el cobre a PcoD, que podría proporcionar el cobre necesario para la multi-cobre oxidasa de PcoA, pero el cobre puede no transitar necesariamente a través del citoplasma en el proceso. El cobre periplásmico puede desintoxicarse uniéndose a sideróforos de catecol oxidados, generados por la PcoA oxidasa, o a la proteína de membrana externa PcoB. PcoE lanza cobre Cu(I) a la PcoA para la oxidación a Cu(II) que es menos tóxico. Adaptado de Rensing y Grass (2003).

Comenzando con el descubrimiento de dos ATPasas de cobre en *E. hirae* en 1992, la homeostasis del cobre se ha estudiado sistemáticamente en esta bacteria Gram-positiva donde el metabolismo del cobre parece ser más claro que en bacterias Gram-

negativas. *E. hirae* posee un operón *cop* que es necesario para la homeostasis de cobre y que consiste en los cuatro genes *copY*, *copZ*, *copA* y *copB*. *copY* codifica un represor sensible al cobre, *copZ* una chaperona de cobre y *copA* y *copB* codifican para las ATPasas de cobre tipo CPx (Odermatt *et al.*, 1992). La función de CopB en la excreción de cobre se demostró mediante el transporte directo de $^{64}\text{Cu}^+$ y $^{m110}\text{Ag}^+$ (Solioz y Odermatt, 1995). La evidencia de que CopA está involucrado en la absorción de cobre es aún indirecta. Se basa en las siguientes cuatro propiedades de una cepa knock-out *copA*: (i) crece como un tipo salvaje bajo condiciones de cobre normales o elevadas, (ii) es más resistente a la plata que la tipo salvaje, presumiblemente porque CopA puede ser una ruta para la entrada de plata en la célula, (iii) no es deficiente en la extrusión de plata desde el citoplasma, y (iv) la acumulación de cobre citoplásmico en presencia de altas concentraciones de cobre es similar a la del tipo salvaje (Odermatt *et al.*, 1993; 1994) .

2.2.7 - Homeostasis de Cadmio, Plomo y Zinc

La homeostasis celular implica la regulación de la captación, secuestro y exporte de metales. Para mantener niveles óptimos mientras se gasta la menor cantidad de energía, las células necesitan proteínas reguladoras para llevar a cabo una respuesta adecuada a la deficiencia o exceso del metal. Ejemplos bien estudiados de proteínas reguladoras sensibles a zinc, cadmio y plomo incluyen: Zur, un homólogo del represor sensible a hierro Fur; CadC, miembro de la familia de represores ArsR/SmtB; y ZntR, un miembro de la familia de activadores de tipo MerR.

Cuando existe deficiencia de zinc, muchas bacterias regulan una serie de operones que se encuentran todos bajo el control de la proteína reguladora Zur (Bsat *et al.*, 1998; Hantke 2005; Gaballa y Helmann, 1998; Patzer y Hantke, 2000). Zur es un miembro de la familia Fur de reguladores sensibles a metales y en muchas bacterias controla no solo la expresión de genes implicados en la absorción de zinc, como *znuABC* y *zinT*, sino también la expresión de hasta cuatro proteínas ribosómicas (Akanuma *et al.*, 2006, Panina *et al.*, 2003).

Para las proteínas que responden a niveles elevados de Zn(II), Cd(II) y Pb(II), principalmente transportadoras, pero también metalotioninas, los represores incluyen CadC, para la resistencia Cd/Pb/Zn en bacterias Gram-positivas (Silver y Phung, 1996), CzrA, implicado en el exporte de zinc cromosómico de *S. aureus* (Singh *et al.*, 1999; Kuroda *et al.*, 1999) y SmtB en *Synechococcus* (Liu *et al.*, 2005). Estos represores pertenecen a la familia de proteínas metaloreguladoras ArsR/SmtB que contienen un dominio conservado implicado en el reconocimiento de ADN. Los miembros de la familia ArsR/SmtB se unen como homodímeros a su secuencia operador-promotor (O/P), reprimiendo así la transcripción de sus respectivos operones (Rensing 2005; Ye *et al.*, 2005).

Como su nombre indica, la familia MerR de activadores transcripcionales se descubrió y caracterizó por primera vez en operones de resistencia al mercurio. La regulación de la resistencia al mercurio se estudió en bacterias Gram negativas y Gram positivas (Brown *et al.*, 2003; Barkay *et al.*, 2003). Sin embargo, posteriormente quedó claro que la familia MerR regula no solo la resistencia a Hg(II) sino también la homeostasis de otros cationes divalentes. En *E. coli*, ZntR regula la ZntA ATPasa de tipo

P para el transporte de Zn(II)/Cd(II)/Pb(II) (Brocklehurst *et al.*, 1998; Outten *et al.*, 1999) y CueR regula la CopA ATPase de tipo P para el transporte de Cu(I)/Ag(I) y la multicobre oxidasa CueO (Outten *et al.*, 2000; Grass y Rensing 2001; Singh *et al.*, 2004).

Los mejores ejemplos de sistemas de unión a quinasa/ADN para la regulación transcripcional del transporte de cationes divalentes, tales como zinc y cadmio en bacterias, son *czcRS* en *Cupriavidus metallidurans* CH34 y *zraRS* en *E. coli*. El sistema CzcRS de *C. metallidurans* regula la expresión del operón *czc* que codifica un sistema de exporte para Cd(II), Zn(II) y Co(II). ZraRS regula la expresión de la proteína de unión al zinc periplásmica ZraP. Se demostró que un sistema similar, *CzrRS* de *Pseudomonas aeruginosa*, también regula el operón *czrCBA* (Van Der Lelie *et al.*, 1999).

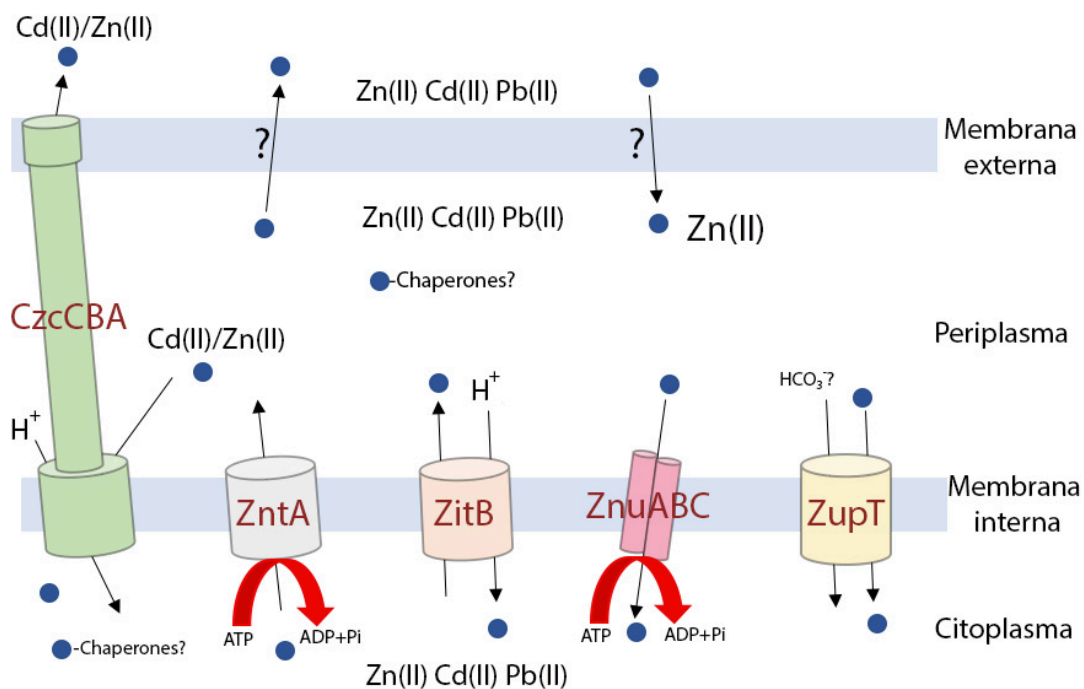


Figura 6. Mecanismos de homeostasis de zinc en bacterias Gram-negativas. Los componentes individuales se discuten en el texto. ZntA es una ATPasa de tipo P de transferencia de Zn(II)/Cd(II)/Pb(II), y ZncCBA una bomba de exporte de tres componentes Cd(II)/Zn(II)/Co(II). Adaptado de Rensing *et al.* (2007).

Dado que el zinc es esencial para todos los organismos, las bajas concentraciones de zinc en el medio ambiente tienen que compensarse mediante sistemas específicos de absorción de zinc (Figura 6). En *E. coli*, el operón *znuABC* es inducido específicamente bajo condiciones limitantes de zinc por Zur (Hantke, 2005; Blencowe y Morby 2003). La expresión de la bomba es reprimida por Zur, que presumiblemente se une a la región promotora bidireccional de *znuA* y *znuBC*. El complejo ZnuABC cataliza la absorción de zinc dependiente de ATP (Patzner y Hantke, 1998). ZnuA es una proteína de unión periplásmica, ZnuB es la permeasa de la bomba y ZnuC es la subunidad catalítica de la ATPasa. Los genes que codifican los homólogos de ZnuABC también se han encontrado en *Haemophilus influenza* y *B. subtilis* entre otros.

En condiciones de suficiencia de zinc, el ATP no tiene que gastarse para la absorción del zinc. Los transportadores de amplio espectro de sustrato son suficientes para las necesidades de zinc de la célula. La ventaja de confiar en transportadores como ZupT, que pertenece a la familia de proteínas ZIP, es que usan mucha menos energía que las ATPasas como ZnuABC (Figura 6). Sin embargo, la fuente de energía que impulsa la absorción de zinc y otros metales por parte de ZupT todavía se desconoce, aunque se ha sugerido el uso de carbonato en otros transportadores ZIP. Se demostró que ZupT participa en la absorción de Zn(II), Fe(II), Co(II), Cd(II) y posiblemente Mn(II) (Grass *et al.*, 2005).

Los cationes Cd(II) y Pb(II) compiten por el transporte con otros elementos fisiológicamente importantes; Pb(II) puede ser absorbido por los sistemas de captación de Ca(II). Los estudios de inhibidores de transporte demuestran que en bacterias Gram positivas, como *S. aureus*, *B. subtilis* y *Lactobacillus plantarum* ATCC14917, el Cd(II) es

absorbido por el transportador de manganeso MntH, un ortólogo de NRAMP (Archibald y Duong, 1984; Que y Helmann, 2000). Otro homólogo bien estudiado de ZntA es CadA del plásmido pI258 de *S. aureus*. El operón *cad* de pI258 tiene dos genes: *cadC*, que codifica un represor transcripcional; y *cadA*, que codifica CadA, una ATPasa tipo P que es aproximadamente 30% idéntica a ZntA. Se ha demostrado que CadA cataliza la absorción de Cd(II) y Zn(II) dependiente de ATP en vesículas de membrana evertida de *B. subtilis* o *E. coli* (Tsai *et al.*, 1992; Rensing *et al.*, 1999). Los homólogos de CadA se han identificado en plásmidos y cromosomas de varias bacterias y arqueas.

Cupriavidus metallidurans CH34 posee un operón único de resistencia al plomo *pbr* que contiene componentes como la P_{1B}-ATPasa PbrA y un represor de la familia ArsR/SmtB, denominado PbrR. (Borremans *et al.*, 2001). PbrT está involucrada en la captación de Pb(II) ya que la expresión de PbrT hace que las células sean hipersensibles al plomo. Esto es una reminiscencia del papel de los transportadores de Hg codificados en operones *mer*. Se cree que estos transportadores protegen el periplasma y la cadena respiratoria del daño inducido por el mercurio llevando Hg(II) directamente desde el periplasma a la reductasa citoplásmica de mercurio MerA. Se cree que la proteína de fusión PbrBC está involucrada en el transporte de Pb (II) a través de la membrana externa.

2.2.8 - Homeostasis de Níquel

Los estudios fisiológicos realizados en *E. coli* han aportado información relevante sobre los mecanismos de absorción celular de Ni²⁺, mecanismos de exporte, y almacenamiento de Ni²⁺ en estas células. Investigaciones adicionales en este

microorganismo han caracterizado los mecanismos por los cuales estos cationes participan en la regulación transcripcional de su homeostasis y han descrito las enzimas que contienen níquel.

Los mecanismos para la absorción celular de Ni^{2+} se han caracterizado en detalle en *E. coli*. Inicialmente, se observó un transportador de Ni^{2+} en *E. coli* debido a lesiones producidas en el locus de *hydC* que producía una baja actividad de hidrogenasa y una absorción deficitaria de Ni^{2+} (Wu y Mandrand-Berthelot, 1986; Wu *et al.*, 1989). La actividad hidrogenasa, que requiere un cofactor de níquel, se restableció cultivando las cepas modificadas de *E. coli* en concentraciones μM de Ni^{2+} , que entran en la bacteria a través de sistemas de transporte de Mg^{2+} . La clonación del locus *hydC* (renombrado *nik*) reveló cinco genes (Long-Fei *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1993) homólogos a la familia de transportadores tipo cassette ABC de unión al ATP que acoplan la hidrólisis de ATP a la translocación del sustrato a través de una membrana. Los miembros de esta familia de transportadores son bastante selectivos (Higgins, 2001), y es interesante que el transportador Nik tenga una homología de secuencia mucho mayor con los transportadores de oligopéptidos y dipéptidos que los otros transportadores de iones metálicos ABC (Tam y Saier, 1993). El transportador Nik consta de dos ATPasas citoplasmáticas asociadas a la membrana (NikD y NikE), dos componentes transmembrana (NikB y NikC) y la proteína de unión periplásmica NikA que también participa en la respuesta de quimiotaxis negativa de *E. coli* a Ni^{2+} (Pina *et al.*, 1995).

Un posible mecanismo de exporte en *E. coli* es *RcnA*, una proteína de membrana inducida por Ni^{2+} (Rodrigue *et al.*, 2005). La mutación de *rcnA* provocó una mayor sensibilidad a Ni^{2+} , así como una acumulación intracelular de Ni^{2+} , lo que sugiere que

esta proteína promueve la salida del exceso de Ni^{2+} . Además, aunque la adición de varios otros metales divalentes al medio de crecimiento no tuvo ningún efecto, el Co^{2+} también indujo la expresión de *RcnA* y el exporte de Ni^{2+} fue bloqueado, lo que sugiere que el exceso de Co^{2+} puede eliminarse mediante el mismo transportador que el Ni^{2+} . La regulación negativa de *rcnA* está controlada, al menos en parte, por el gen proximal *rcnR* (Iwig *et al.*, 2006) y la unión Fur a las regiones promotoras de *rcnA* sugiere una conexión con la homeostasis del hierro (Koch *et al.*, 2007).

Los estudios genéticos del operón *nik* han revelado que es inducido en condiciones anaeróbicas por el regulador sensible al oxígeno Fnr (Wu y Mandrand-Berthelot, 1986; Wu *et al.*, 1989), responde a metabolitos celulares que también afectan a la expresión de hidrogenasas, como el nitrato (Rowe *et al.*, 2005), y es reprimido por Ni^{2+} (Wu y Mandrand-Berthelot, 1986; Wu *et al.*, 1989; de Pina *et al.*, 1999). Esta última actividad se debe a la proteína codificada por *nikR*, que se sitúa justo por debajo del operón *nik* y se expresa bajo el control de su propio promotor constitutivo, además de una regulación parcial por el promotor *nik* (de Pina *et al.*, 1999).

Los mecanismos utilizados por *E. coli* para tolerar el Ni^{2+} también se encuentran en muchos otros microorganismos, en algunos casos con variaciones. De manera similar, los aspectos reguladores de Ni^{2+} encontrados en *E. coli* se pueden extrapolar a otros microorganismos. Finalmente, una amplia gama de microorganismos contiene las mismas metaloenzimas ya descritas para *E. coli*, pero se conocen varias enzimas dependientes de níquel y cobalto adicionales. El Ni^{2+} es captado indiscriminadamente por células que usan varios sistemas de transporte de Mg^{2+} (Moncrief y Maguire, 1999). Además, varios microorganismos poseen transportadores ABC específicos de Ni^{2+}

similares al sistema *nik* en *E. coli* (Rodionov *et al.*, 2006). Las bacterias utilizan tres mecanismos principales para lograr tolerancia a los iones metálicos, todos relacionados con el exporte de las sustancias tóxicas al exterior de las células (Nies, 2003). La familia HME (heavy metal efflux) de proteínas RND se extienden desde el interior de la célula a través de la membrana citoplásmica, periplasma y membrana externa, y utilizan un mecanismo de protón-antiprotón para bombear iones metálicos desde el periplasma al exterior de la célula. Finalmente, las ATPasas de tipo P utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para catalizar el exporte de iones metálicos a través de la membrana citoplásmica. Las bacterias parecen utilizar principalmente los primeros dos mecanismos para lograr tolerancia al Ni²⁺ (Nies, 1999; 2003; Haney *et al.*, 2005).

2.3 - Antibióticos

En sentido literal, el término “antibiótico” se entiende como opuesto o contrario a la vida, un tanto irónico cuando hablamos de compuestos que han ayudado a salvar miles de vidas a lo largo de la historia. Se puede definir como cualquier clase de molécula orgánica que inhibe el crecimiento o causa la muerte celular microbiana debido a interacciones específicas con dianas bacterianas. Estos compuestos se utilizan para tratar infecciones bacterianas debido a su efecto bacteriostático o bactericida. Un gran número de antibióticos de uso habitual, provienen de bacterias del suelo, como es el caso del género *Streptomyces*, productora de una amplia gama de antibióticos como las tetraciclinas (Chopra y Roberts, 2001).

2.3.1 - Historia de los antibióticos

A principios del siglo XX, Paul Ehrlich, un médico alemán, notó que ciertos tintes químicos coloreaban algunas células bacterianas y otras no, y concluyó que, de acuerdo con este principio, debe ser posible crear sustancias que puedan matar selectivamente a ciertas bacterias sin dañar otras células. En 1909, descubrió que un químico llamado arsfenamina era un tratamiento efectivo para la sífilis. Este se convirtió en el primer antibiótico moderno, aunque el propio Ehrlich se refirió a su descubrimiento como "quimioterapia". La palabra "antibióticos" fue utilizada por primera vez más de 30 años después por el inventor y microbiólogo Selman Waksman, quien en su vida descubrió más de 20 antibióticos (Yasdankhah *et al.*, 2013).

A finales de los años veinte, los Laboratorios Bayer en Alemania comenzaron a probar diferentes tintes sintéticos con actividad antibacteriana, y en 1932 descubrieron la primera sulfamida antimicrobiana, llamada Prontosil. Las sulfamidas fueron ampliamente utilizadas hasta el final de la Segunda Guerra Mundial (Debabov, 2013).

Fleming (1929), descubrió accidentalmente penicilina. Al regresar de unas vacaciones en Suffolk en 1928, notó que un hongo, *Penicillium notatum*, había contaminado una placa de cultivo de *Staphylococcus* que accidentalmente había dejado al descubierto. El hongo había creado zonas libres de crecimiento bacteriano y Fleming lo aisló. Descubrió que *P. notatum* era extremadamente efectivo incluso a concentraciones muy bajas, previniendo el crecimiento de *Staphylococcus* incluso al ser diluido 800 veces, y era menos tóxico que los desinfectantes utilizados en ese momento. A pesar de su investigación sistemática de las propiedades antibacterianas de esta nueva

sustancia, no fue hasta 1941 que el primer paciente pudo ser tratado con penicilina a través del trabajo de Walter Florey y Ernst Boris Chain, e incluso más tiempo hasta que fue posible la producción a gran escala (Ligon, 2004).

Los siguientes 20 años vieron el descubrimiento de muchas clases nuevas de antibióticos, e incluso más derivados semisintéticos de sustancias naturales con un espectro mejorado y propiedades farmacocinéticas (Debabov, 2013; Hewitt, 1967).

Los antibióticos recién descubiertos no solo se usaban en medicina humana; pronto se descubrió que la adición de bajas dosis de antibióticos como penicilina o tetraciclina a la alimentación animal aumentaba la tasa de crecimiento de los animales. Esto rápidamente se convirtió en un gran negocio para la industria farmacéutica, y ya en 1964, las cantidades de penicilina utilizadas en el ganado eran casi tan grandes como las utilizadas para tratar pacientes (Hewitt, 1967). Desde entonces, el uso de antibióticos ha aumentado dramáticamente (Marshall y Levy, 2011).

Es relativamente fácil encontrar sustancias químicas que matan bacterias, pero no sustancias que podrían usarse como antibióticos de uso clínico. De hecho, el descubrimiento más reciente de una nueva clase de antibióticos fue la teixobactina en 2015 (Ling *et al.*, 2015), 28 años desde el descubrimiento de la daptomicina en 1987 (Silver, 2011). Si bien hay algunos antibióticos nuevos actualmente en desarrollo, no sabemos cuándo y si se podrán utilizar como medicamentos para tratar infecciones.

2.3.2 - Antibióticos en la naturaleza

La mayoría de los antibióticos naturales que se han descubiertos son producidos por microorganismos provenientes del suelo, como las bacterias del género *Streptomyces* y *Actinomyces* (Aminov, 2009; Fischbach y Walsh, 2009). Las funciones biológicas de los antibióticos no se comprenden por completo, pero se cree que son armas en la "guerra química" microbiana, donde le darían al productor una ventaja de crecimiento al inhibir el crecimiento de sus competidores. Algunos teorizan que la producción de antibióticos en la naturaleza es parte de una compleja interacción entre organismos en la que el beneficio de producir antibióticos para inhibir constantemente a su vecino debe equilibrarse con la carga metabólica de esta producción. Los productores de antibióticos compiten contra bacterias sensibles y resistentes (no productoras). Una cepa productora de antibióticos puede superar a una cepa sensible, ya que se inhibirá el crecimiento de la misma. Una cepa resistente puede competir con una cepa productora de antibióticos, ya que producir sustancias antibióticas es costoso, pero no puede competir con la cepa sensible, ya que llevar la resistencia generalmente también es costoso, pero no tan costoso como producir antibióticos. Esta lucha constante podría contribuir a la diversidad genética y metabólica en tales ecosistemas (Czárán *et al.*, 2002).

Cuando una bacteria se vuelve resistente a un antibiótico debido a una mutación, generalmente se ve acompañada de un "coste" (Björkman *et al.*, 2000), conocido como "fitness cost", por ejemplo, una reducción en el crecimiento (Andersson, 2001; Andersson y Hughes, 2010).

Entre los principales factores que determinan la frecuencia de aparición de resistencias en una población bacteriana están el volumen de uso del antibiótico, el coste adaptativo de la resistencia y la capacidad de la bacteria para compensar genéticamente dicho coste. Por lo general, las resistencias conferidas tanto por plásmidos como cromosómicamente provocan estos costes y en ese caso las mutaciones compensatorias pueden aminorar dichos costes sin que esto se asocie inevitablemente a una pérdida de la resistencia (Andersson, 2001; Andersson y Levin, 2009). Estas mutaciones compensatorias ocurren más comúnmente que la simple reversión a la sensibilidad a los antibióticos (Andersson y Levin, 2009). Esto significa que después de la exposición a antibióticos, se facilita la acumulación de más mutaciones con la esperanza de restaurar la aptitud parcial o total en lugar de corregir la mutación inicial.

Otros especulan que la función principal de los antibióticos en la naturaleza es actuar como moléculas de señal de comunicación microbiana y detección de quórum, y que sus efectos letales en dosis altas son principalmente involuntarios (Aminov, 2009). También desempeñan un papel importante en la producción de factores de virulencia e influyen en las interacciones huésped-parásito (por ejemplo, fagocitosis, adherencia a la célula diana, etc.). En el ecosistema natural, las concentraciones de antibióticos producidos son mucho menores que en un entorno clínico, y en niveles tan bajos se ha demostrado que alteran la expresión de muchos genes diferentes (Fajardo y Martínez, 2008). En *P. aeruginosa*, se ha demostrado que niveles subinhibitorios de tobramicina inducen la formación de biopelículas mediante activación de un regulador de respuesta a aminoglucósidos. La producción de antibióticos en bacterias del suelo también se

regula con frecuencia a través de mecanismos de detección de quórum, lo que indica una posible función de señal (Aminov, 2009).

2.3.3 - Clasificación de antibióticos

Desde que comenzamos a usar antibióticos para tratar infecciones bacterianas, se han encontrado bacterias resistentes en la clínica (Yasdankhah *et al.*, 2013). Casi todos los patógenos humanos más especializados fueron en principio totalmente susceptibles a la mayoría de los antibióticos, pero décadas de uso y el uso indebido de antibióticos han cambiado por completo el panorama (Nikaido, 1994). Un organismo se denomina resistente cuando un cambio en la susceptibilidad hace que el antibiótico sea ineficaz contra este organismo. Muchos organismos son capaces de ser insensibles y, por lo tanto, se consideran intrínsecamente resistentes a un agente particular por naturaleza de su fisiología o bioquímica. Una amplia gama de mecanismos bioquímicos y fisiológicos pueden ser responsables de la resistencia a los antimicrobianos. Existen cinco sitios de acción principales para los antibióticos: la pared celular bacteriana, la membrana celular, la síntesis de proteínas, la síntesis de ADN y ARN y el metabolismo del ácido fólico (vitamina B9) (Wright, 2010). En la Tabla 1, se muestra una colección de antibióticos comúnmente usados, modos de acción y mecanismos de resistencia.

La resistencia a los antibióticos se produce a través de cuatro mecanismos generales: modificación de la diana, exporte, inmunidad y bypass y destrucción catalizada por enzimas. La modificación de la diana puede ocurrir a través de la mutación de los propios sitios de acción o mediante la producción de enzimas que los modifican. Por ejemplo, la resistencia a la vancomicina es una versión de la modificación de la diana

donde se emplea una nueva maquinaria biosintética para alterar la estructura de la pared celular (Wright, 2010). El exporte se produce a través de una gran familia de bombas de proteínas que expulsan antibióticos del interior al exterior de la célula. En inmunidad, los antibióticos o sus dianas están unidos por proteínas que evitan que el antibiótico se una a su objetivo. Sin embargo, los mecanismos más específicos y evolucionados de la resistencia a los antimicrobianos son las enzimas que reconocen los antibióticos y los modifican de tal forma que eliminan las características funcionales que les permiten interactuar con sus objetivos. Por ejemplo, las β -lactamasas rompen hidrolíticamente el anillo β -lactámico central que es característico de esta clase de antibióticos y crucial para su acción (Wright, 2010).

Tabla 1. Modos de acción y mecanismos de resistencia de los antibióticos comúnmente utilizados (adaptado de Davies y Davies, 2010).

| Clase | Uso antibiótico | Espectro | Objetivo | Mecanismo de resistencia |
|---------------|-----------------|---|--------------------------------|---|
| Cefalosporina | Cefotaxima | Actividad de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas | Biosíntesis del peptidoglicano | Hidrólisis, Exporte, alteración de sitio diana |
| | Ceftriaxona | | | |
| | Ceftazidima | | | |
| Penicilina | Ampicilina | Actividad contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas | Biosíntesis del peptidoglicano | Hidrólisis, Exporte, alteración de sitio diana |
| | Amoxicilina | | | |
| Glucopéptido | Vancomicina | Actividad contra bacterias Gram positivas | Biosíntesis del peptidoglicano | Reprogramación en la biosíntesis del peptidoglicano |
| Quinolonas | Ciprofloxacina | Actividad de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas | Replicación del ADN | Acetilación, Exporte, alteración de sitio diana |

| | | | | |
|----------------|----------------------------|---|----------------------------|--|
| Sulfonamida | Sulfisoxazol | Actividad contra una amplia gama de bacterias Gram negativas y Gram positivas | Metabolismo C ₁ | Exporte, Alteración de sitio diana |
| | Trimetoprim-sulfametoxazol | | | |
| | Sulfadiazina | | | |
| Oxazolidinona | Linezolid | Activo contra la mayoría de las bacterias Gram positivas | Traslación | Exporte, Alteración de sitio diana |
| Aminoglucósido | Estreptomicina | Actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas | Traslación | Fosforilación, Acetilación, nucleotidilación, Exporte, Alteración de sitio diana |
| Tetraciclina | Oxitetraciclina | Actividad de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas | Traslación | Monooxigenación, Exporte, Alteración de sitio diana |
| | Doxiciclina | | | |
| | Tetraciclina | | | |
| | Minociclina | | | |
| Fenicol | Cloranfenicol | Actividad contra una gran variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas | Traslación | Acetilación, Exporte, Alteración de sitio diana |

2.3.4 - Resistencia a antibióticos

Cuando se usa la expresión "resistencia a los antibióticos", es importante diferenciar entre resistencia intrínseca y adquirida. Las bacterias intrínsecamente resistentes se pueden definir como "resistentes sin ninguna mutación cromosómica ni adquisición de genes de resistencia" (Nikaido, 1994). Algunas bacterias son resistentes porque carecen de las estructuras diana, como *Mycoplasma*; son resistentes a los

inhibidores de la síntesis de peptidoglicanos tales como β -lactámicos y glicopéptidos, ya que carecen de una pared celular de peptidoglicano (Taylor-Robinson y Bébéar, 1997). En otros casos, esta resistencia intrínseca se debe a que los antibióticos nunca alcanzan sus moléculas diana dentro de las células como resultado de las barreras de permeabilidad o exporte (Putman *et al.*, 2000).

A lo largo de la historia ha quedado demostrado que después de la introducción de nuevos compuestos, ha seguido el desarrollo y la diseminación de la resistencia a estos nuevos antibióticos. En la actualidad nos enfrentamos a las graves consecuencias, patógenos no tratables, que son capaces de sobrevivir al tratamiento con todos los antibióticos conocidos. Esto puede atribuirse en parte a décadas de consumo incontrolado de antibióticos, tanto del entorno agrícola como humano (Schmitz *et. al.*, 1999; Chamilos *et. al.*, 2011), pero también al hecho de que la evolución y la selección natural es una parte intrínseca de este proceso. La resistencia evoluciona como una ventaja selectiva natural, donde un organismo capaz de sobrevivir a los antibióticos, prosperará mientras que otros organismos sucumbirán a la acción de estos compuestos (Ben-Ami *et. al.*, 2013).

En el caso de los antibióticos, impulsarán intrínsecamente la selección de microorganismos resistentes si el perfil genético está presente en la población. Una vez que un patógeno resistente se ha afianzado, puede diseminarse por toda la población, y si este perfil de resistencia no presenta efectos secundarios perjudiciales, con el tiempo esos genotipos se volverán cada vez más frecuentes (Ben-Ami *et. al.*, 2013).

El primer paso en la aparición de la resistencia implica cambios genéticos en la bacteria. Hay dos formas en que esto puede suceder. Las bacterias sensibles pueden volverse resistentes a través de mutaciones de ADN preexistente o mediante la adquisición de genes completos, por ejemplo, plásmidos o una combinación de ambos. En principio, la resistencia solo tiene que surgir una vez en una especie bacteriana, y luego la resistencia adquirida se puede diseminar a través de las poblaciones bacterianas y las fronteras geográficas con el tiempo. Por ejemplo, las NDM-1 *B*-lactamasas se descubrieron en Nueva Delhi en India en 2008 y ahora se encuentran en todos los continentes (Johnson y Woodford, 2013; Walsh *et al.*, 2011; Kumarasamy *et al.*, 2010).

Es evidente que la presión selectiva juega un papel importante tanto en la aparición como en la transmisión de la resistencia (Hastings *et al.*, 2004; Roberts y Mullany, 2009).

2.3.5 - Transmisión horizontal de genes y elementos genéticos móviles

El nicho ecológico de los patógenos humanos es fundamentalmente diferente al de las bacterias del suelo, y hasta hace relativamente poco no habían tenido la presión selectiva para desarrollar genes de resistencia a antibióticos, debido a que nunca se habrían encontrado con ningún organismo productor de antibióticos (Fajardo y Martínez, 2008). Para los antibióticos que derivan de fuentes naturales, el mecanismo de resistencia más común es adquirir nuevos genes que codifican enzimas que degradan el antibiótico o modifican su objetivo, o bien por bombas que eliminan específicamente el fármaco del citoplasma (Spratt, 1994). Dado que las bacterias patógenas no poseían estos genes de resistencia antes de que los humanos comenzaran a usar antibióticos,

deben haberlos adquirido de alguna manera a partir de bacterias no patógenas (Martínez, 2009).

Los genes de resistencia no son algo reciente, el análisis de bacterias aisladas de lugares con muy poco o ningún contacto con humanos ha mostrado la presencia de diversos genes que codifican resistencia a antibióticos (Bhullar *et al.*, 2012). En muchos casos, estos genes están presentes en cepas productoras de antibióticos como *streptomyces*, los cuales son necesarios para la protección ante sus propios antibióticos (D'Costa *et al.*, 2006), pero es posible que estos genes de resistencia tuvieran otras funciones en el organismo nativo (Aminov, 2009). El problema al que nos enfrentamos en la actualidad es la transferencia de estos genes de bacterias no patógenas a bacterias taxonómicamente muy distantes en el microbioma humano y patógenos humanos (Martínez, 2008; Forsberg *et al.*, 2012).

El papel de la transferencia horizontal de genes (HGT) en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) se ha descrito ampliamente. La HGT puede ocurrir principalmente de tres formas diferentes: conjugación (es decir, transferencia genética por medio de plásmidos), transducción (transferencia genética mediada por bacteriófagos) y transformación (es decir, la absorción de ADN libre del entorno) (von Wintersdorff *et al.*, 2016). Los elementos genéticos móviles tales como plásmidos, integrones, transposones y bacteriófagos son los principales vehículos en los procesos de conjugación y transducción (Frost *et al.*, 2005). Sin embargo, el proceso de conjugación generalmente se considera como el mecanismo principal de la transferencia horizontal de genes para ARGs en diversos entornos (Huddlestone, 2014). Por lo tanto, es importante entender en qué medida los genes de resistencia en

bacterias del medio ambiente pueden diseminarse por estos mecanismos, lo que permite que las poblaciones bacterianas se adapten rápidamente a una fuerte presión selectiva de antibióticos u otros compuestos xenobióticos.

2.3.6 - Elementos genéticos móviles

Una parte importante de la transferencia horizontal de genes entre diferentes especies, especialmente genes de resistencia, se da a través de elementos genéticos móviles, como transposones, integrones y plásmidos (Stokes y Gillings, 2011).

Los transposones son elementos genéticos con la capacidad de moverse de una ubicación genética a otra. Esto se logra a través de la enzima llamada transposasa, y el gen que codifica esta proteína que generalmente se transporta en el propio transposón. Las secuencias que indican los extremos del transposón son repeticiones invertidas, reconocidas por la transposasa. Los transposones no dependen de la homología de secuencia para la inserción y pueden insertarse aleatoriamente, pero las transposasas a veces tienen ciertas preferencias de secuencia (Calos y Miller, 1980). Los transposones pueden saltar entre diferentes ubicaciones en un genoma bacteriano, pero también pueden transferirse horizontalmente a través de plásmidos conjugativos o fagos transductores. Algunos transposones se recortan físicamente del genoma durante la transposición y luego se insertan en otro lugar, mientras que otros se copian (Grinstead *et al.*, 1990).

La transposición es potencialmente destructiva para el huésped, ya que las inserciones son aleatorias y pueden alterar genes importantes, por lo que la mayoría de

los transposones están sujetos a una estricta regulación y son poco frecuentes (Nagy y Chandler, 2004).

Los transposones más pequeños se denominan elementos de secuencia de inserción (elementos IS) y consisten en el gen transposasa y las repeticiones invertidas flanqueantes. Los elementos IS son extremadamente comunes y se pueden encontrar en casi todas las bacterias y en muchos plásmidos conjugativos (Siguier *et al.*, 2006).

Un tipo más grande de transposones son los transposones compuestos. Estos consisten en dos elementos IS, genes accesorios, y cuando saltan también transponen el ADN entre ellos (Calos y Miller, 1980). Como solo requieren un gen de transposasa para funcionar, no siempre son simétricos, y uno de los elementos de secuencia de inserción puede tener una transposasa defectuosa. Los transposones compuestos pueden crearse aleatoriamente mediante dos elementos IS que se insertan cerca uno del otro (Mahillon *et al.*, 1999).

En los llamados transposones unitarios o no compuestos, los genes accesorios son parte de la unidad central de transposones, y en lugar de dos elementos IS solo tienen un par de repeticiones invertidas en los extremos (Grinsted *et al.*, 1990).

Los integrones son elementos genéticos que probablemente han existido durante cientos de millones de años. Son sistemas genéticos basados en la recombinación que usan cassettes genéticos para generar diversidad genómica, y son muy comunes en bacterias ambientales del suelo y agua (Gillings, 2014).

Un integrón contiene mínimo tres componentes diferentes. Un gen que codifica una recombinasa llamada integrasa, un sitio de recombinación reconocido por la integrasa llamado *attI*, y finalmente un promotor que dirige la expresión de los cassettes. El integrón puede adquirir nuevos genes a partir de un grupo de cassettes que pueden intercambiarse entre diferentes integrones (Collis y Hall, 1995). Estos cassettes generalmente solo contienen un marco de lectura abierto con un sitio de unión a ribosoma (RBS) y un sitio de recombinación llamado *attC* (Stokes *et al.*, 2001). Pueden existir en una forma circular libre que puede ser captada por los integrones e insertada en una matriz de genes. Los cassettes son reconocidos e integrados a través de la recombinación específica de sitio entre *attI* y *attC*, colocando el nuevo gen junto al promotor (Partridge *et al.*, 2009). Este intercambio e integración controlada de nuevos genes tiene muchos beneficios. Dado que los genes están siempre integrados en un sitio específico, no corren el riesgo de alterar los genes cromosómicos. También se insertan en la orientación correcta frente a un promotor, lo que garantiza que los genes recién adquiridos se puedan expresar y utilizar inmediatamente (Gillings, 2014).

Los integrones encontrados en bacterias patógenas en la clínica generalmente pertenecen a los integrones de clase 1, un tipo que normalmente se encuentra en las bacterias del suelo y el agua dulce (Stokes *et al.*, 2001). A diferencia de los integrones encontrados en las bacterias ambientales, los integrones encontrados en la clínica son construcciones muy recientes, que han evolucionado durante los últimos 70 años desde que los humanos comenzaron a usar antibióticos. Muchos integrones de resistencia comunes portan algunos genes como el gen *qac* truncado (*qacEΔ1*) y el gen *sul1*, que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario (QAC) y sulfonamidas,

respectivamente (Gillings *et al.*, 2009). Estos integrones son generalmente móviles y pueden llevar una amplia variedad de cassettes de genes de resistencia. En la naturaleza, hay una enorme diversidad de integrones, mientras que en contraste los encontrados en la clínica son muy similares (Gillings, 2014).

En la actualidad, las bacterias que portan integrones de resistencia a múltiples fármacos están muy extendidas, tanto en humanos como en la agricultura y el medio ambiente. Los estudios realizados en animales de granja en España muestran que hasta el 80% de la *E. coli* intestinal tiene integrones; la mayoría de ellos son de clase 1 (Marchant *et al.*, 2013). Estos integrones también son increíblemente comunes en bacterias aisladas en plantas de tratamiento de agua y suelos agrícolas (Li *et al.*, 2009; Byrne-Bailey *et al.*, 2011).

Los plásmidos son uno de los vectores más importantes en la transferencia horizontal de genes debido a su capacidad de propagar rápidamente genes entre especies bacterianas no relacionadas (Smillie *et al.*, 2010). Su papel en la difusión de genes de resistencia a antibióticos fue introducido por Foster (1983), y hoy en día los plásmidos conjugativos portadores de genes de resistencia se han convertido en un problema, especialmente en bacterias Gram-negativas del entorno clínico (Piddock, 2012). Los plásmidos no son nuevos, pero su papel en la difusión de resistencia a los antibióticos sí lo es. Los estudios de plásmidos provenientes de bacterias de la "era preantibiótica" han demostrado que los plásmidos eran comunes incluso antes del uso de antibióticos, pero carecían de genes de resistencia a antibióticos (Hughes y Datta, 1983). Mientras que los elementos genéticos móviles como los transposones pueden

mover genes de resistencia entre diferentes plásmidos o el cromosoma, los plásmidos pueden transferir estos genes a diferentes bacterias.

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN, capaces de replicarse independientemente del cromosoma bacteriano. Por lo general, contienen los genes necesarios para la replicación, la estabilidad y la partición, además de genes accesorios como los que confieren resistencia a los antibióticos. Dos plásmidos que usan los mismos sistemas de replicación no pueden mantenerse de forma estable en la misma célula; en base a estos plásmidos se dividen en diferentes grupos de incompatibilidad (Carattoli, 2009). Los plásmidos conjugativos también portan genes para la transferencia entre bacterias, llamados genes *tra* (Frost *et al.*, 1994). Muchos de los plásmidos conjugativos aislados en hospitales tienen una amplia gama de genes de resistencia a antibióticos, así como genes que confieren resistencia a biocidas o metales como plata, cobre, mercurio y arsénico (Chen *et al.*, 2007; Woodford *et al.*, 2009; Sandegren *et al.*, 2012).

2.3.6 - Transferencia de genes en la cadena alimentaria

Hoy en día hay disponemos de evidencia que demuestra que el uso de antibióticos en la alimentación animal contribuye al problema en el aumento de bacterias resistentes a los antibióticos en la clínica provenientes de productos alimenticios (Smith *et al.*, 2002). Un estudio en Holanda en 1997 mostró la presencia de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) presentes en la flora intestinal del 20% de las personas que consumían carne, mientras que estaba completamente ausente en vegetarianos, lo que indica que el consumo de carne contaminada era la fuente

(Schouten *et al.*, 1997). En 2007, las bacterias aisladas de carne de pollo comercial se compararon con bacterias aisladas de pacientes en un hospital cercano, y los resultados mostraron que las bacterias resistentes a antibióticos de los pacientes eran idénticas a las cepas de estas aves de corral, mientras que las cepas susceptibles no lo eran (Johnson *et al.*, 2007). También se ha demostrado que *E. coli* resistente a múltiples fármacos causante de infecciones en el tracto urinario en humanos es de origen animal, muy probablemente transferido a través de productos lácteos o cárnicos contaminados (Ramchandani *et al.*, 2005). Otro estudio realizado en aislados multirresistentes de *Salmonella typhimurium*, provenientes de humanos y animales de granja recogidas durante un período de 22 años, mostró que cada huésped tenía sus propias poblaciones de *Salmonella*, pero que hubo intercambio de bacterias y genes de resistencia entre los animales y poblaciones bacterianas humanas (Mather *et al.*, 2013).

El riesgo de transferencia no se limita a carne y productos lácteos; Cuando los humanos comen cultivos como tubérculos, raíces o las hojas en contacto con el suelo como lechugas o endivias, también existe el riesgo de que las verduras estén contaminadas con bacterias patógenas (Natvig *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2015). Algunos de las bacterias resistentes en el suelo podrían invadir las plantas a través de los poros del tejido superficial y daños en el tejido vegetal y colonizarlo como bacterias endofíticas resistentes a los antibióticos (AREB) (Wang *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta la relación simbiótica entre AREB y las plantas durante toda la fase de crecimiento, las AREB traen consigo una amenaza directa contra la salud humana a través de la acumulación de la cadena alimentaria (Friedman, 2015; Ongeng *et al.*, 2015).

OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

La resistencia a antibióticos constituye uno de los retos globales más importantes en la sociedad de hoy en día. Las infecciones causadas por bacterias resistentes son responsables de cientos de miles de muertes cada año y la contaminación medioambiental con metales pesados, especialmente con cobre, supone una fuerte presión selectiva que favorece la propagación de esta resistencia a antimicrobianos en ambientes naturales.

La asociación genética entre diferentes genes de resistencia pone de manifiesto la capacidad potencial de los metales pesados para promover y facilitar el desarrollo de resistencias a antibióticos en cepas bacterianas muy diversas, incluidas aquellas que son patógenas para el ser humano. El reconocimiento de esta dimensión medioambiental del desarrollo de resistencias a antibióticos ha hecho necesaria la investigación de bacterias multi-resistentes no sólo en el ámbito clínico, sino también en ambientes naturales.

Los compuestos derivados de cobre se emplean de forma rutinaria en el olivar de la provincia de Jaén para prevenir o tratar infecciones causadas por el hongo *Spilocaea oleagina* y algunos estudios previos ya han puesto de manifiesto que la contaminación de los suelos con cobre favorecen el desarrollo en este ecosistema de bacterias multi-resistentes, no sólo tolerantes a distintos metales pesados, sino también resistentes a antibióticos de muy diversos grupos farmacológicos y con un amplio uso en clínica humana.

Atendiendo a estos antecedentes, parece oportuno plantear los siguientes objetivos:

1. Aislar bacterias tolerantes a metales pesados a partir de suelos de olivar tratados de forma prolongada con compuestos derivados de cobre.
2. Identificar los microorganismos tolerantes aislados.
3. Realizar un estudio comparativo de la tolerancia al cobre en los microorganismos aislados, en función de las concentraciones de cobre detectadas en los suelos muestreados.
4. Evaluar la tolerancia a diversos metales pesados y la resistencia a antibióticos de interés en clínica humana en las cepas aisladas.
5. Determinar si la tolerancia a metales pesados se correlaciona con un incremento en la resistencia a antibióticos.
6. Estudiar la presencia de determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados y de resistencia a antibióticos en las cepas multi-resistentes aisladas.
7. Investigar posibles correlaciones entre determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados y fenotipo de resistencia a antibióticos.
8. Investigar posibles correlaciones entre determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados y la presencia de genes de resistencia a antibióticos en las cepas seleccionadas.
9. Identificar combinaciones de genes y de forma indirecta combinaciones de agentes selectivos con elevado riesgo de co-selección de resistencias.

MATERIAL Y MÉTODOS

4 - MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 - Recolección de muestras y determinación de la concentración de cobre en suelo

Las muestras de suelo se recogieron entre diciembre de 2013 y febrero de 2014 en 45 campos de olivos seleccionados al azar a lo largo de la provincia de Jaén (Andalucía, España). Las ubicaciones geográficas de los sitios se muestran en la Figura 7 y las coordenadas geográficas se resumen en la Tabla 2. Las muestras fueron recogidas a una profundidad de 5 a 10 centímetros de la superficie en cada ubicación según lo descrito por Menjívar *et al.* (2009), se almacenaron en bolsas de plástico estériles y se transportaron al laboratorio para su análisis. Las bacterias se aislaron el mismo día de la recolección y cuando no fue posible, las muestras se almacenaron a 4°C y el aislamiento se realizó a la mayor brevedad posible.

Las concentraciones de cobre en muestras de suelo seco se analizaron tras extracción con pentaacetato de dietilentriamina (DTPA) según Lindsay y Norvell (1978). Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). La solución de extracción (CaCl_2 0,01 M, DTPA 0,005 M y trietanolamina 0,1 M) se ajustó a pH 7,3 con HCl 1 N. Se añadieron 10 g de cada una de las muestras a 20 ml de solución de extracción y la suspensión se mantuvo en agitación (120 rpm) durante 2 horas. Las suspensiones se filtraron (papel de filtro Whatman grado 42). La concentración de Cu se determinó con un espectrómetro (Perkin Elmer Optima 8000) mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Los valores obtenidos se reflejan en la Tabla 2.

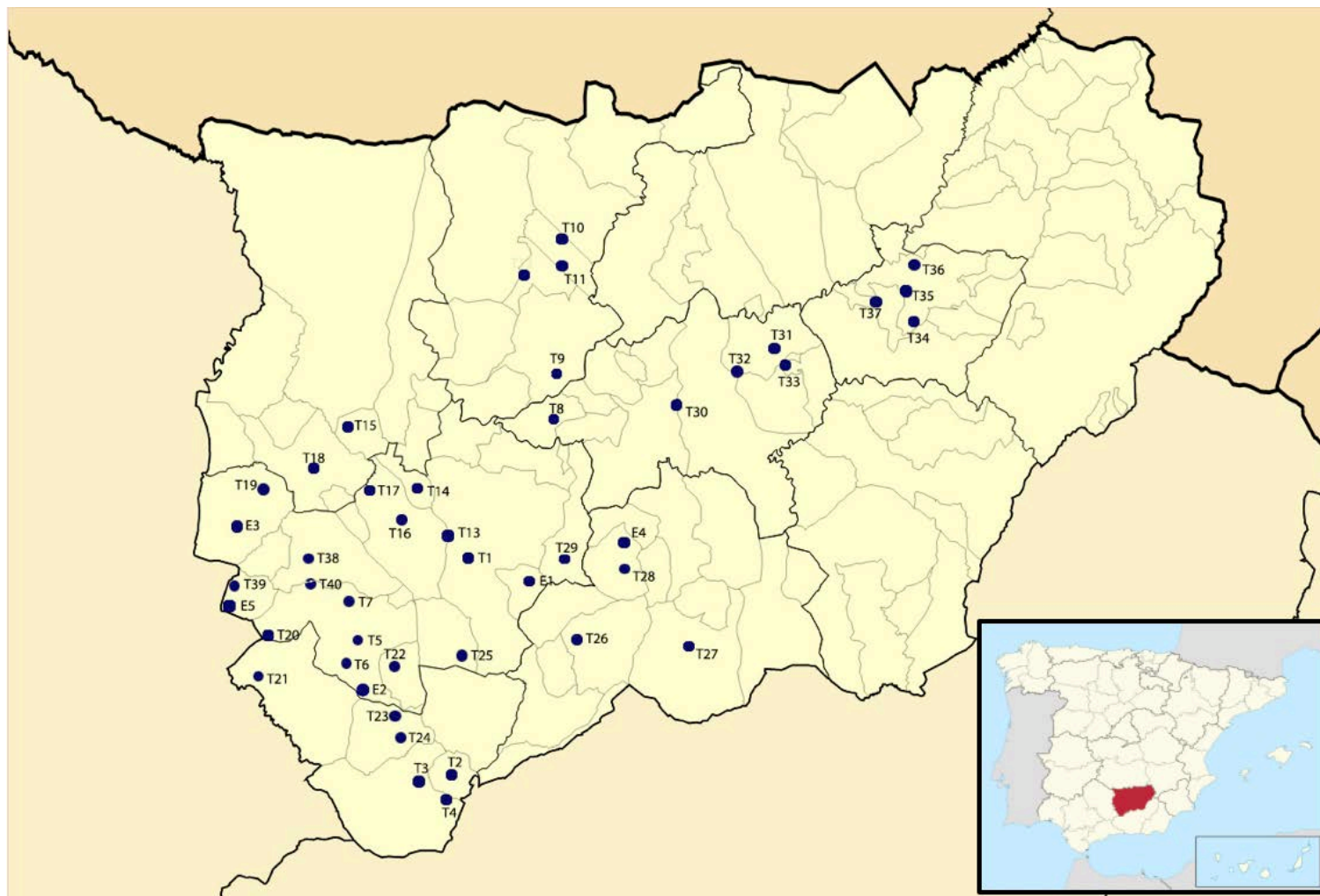


Figura 7. Localización geográfica de los sitios de recolección de muestras de suelo.

Tabla 2. Coordenadas de localización de sitios de toma de muestras de suelo y concentración de cobre por muestra (mg).

| Muestra | Coordenadas | Concentración de Cu | Muestra | Coordenadas | Concentración de Cu |
|---------|--------------------|---------------------|---------|--------------------|---------------------|
| UJAT1 | 37,79221, -3,79283 | 6,53±0,42 | UJAT24 | 37,54825, -3,9156 | 4,99±0,11 |
| UJAT2 | 37,48967, -3,83392 | 7,73±0,19 | UJAT25 | 37,65661, -3,80598 | 4,56±0,27 |
| UJAT3 | 37,48783, -3,85444 | 3,11±0,57 | UJAT26 | 37,67978, -3,60633 | 6,14±0,83 |
| UJAT4 | 37,48204, -3,83491 | 4,79±0,36 | UJAT27 | 37,66823, -3,41469 | 5,61±1,60 |
| UJAT5 | 37,65598, -3,98065 | 14,37±0,18 | UJAT28 | 37,79666, -3,52324 | 9,81±1,52 |
| UJAT6 | 37,65717, -3,98312 | 7,74±1,65 | UJAT29 | 37,79149, -3,6288 | 36,61±3,18 |
| UJAT7 | 37,73206, -3,99734 | 36,91±4,31 | UJAT30 | 38,00514, -3,43801 | 25,75±1,78 |
| UJAT8 | 37,98506, -3,63819 | 9,10±1,63 | UJAT31 | 38,08356, -3,2689 | 7,67±1,57 |
| UJAT9 | 38,05809, -3,64059 | 9,39±1,31 | UJAT32 | 38,0513, -3,33233 | 12,44±2,18 |
| UJAT10 | 38,23534, -3,63329 | 8,17±0,52 | UJAT33 | 38,08289, -3,24976 | 21,36±1,58 |
| UJAT11 | 38,22511, -3,63571 | 5,2±0,05 | UJAT34 | 38,14596, -3,0348 | 12,46±1,71 |
| UJAT12 | 38,18513, -3,69829 | 17,66±2,13 | UJAT35 | 38,16303, -3,04211 | 32,61±2,81 |
| UJAT13 | 37,82323, -3,82713 | 2,81±0,71 | UJAT36 | 38,19932, -3,02816 | 77,78±5,26 |
| UJAT14 | 37,87953, -3,89005 | 2,88±0,38 | UJAT37 | 38,16141, -3,09868 | 9,83±0,43 |
| UJAT15 | 37,97435, -3,99866 | 13,92±0,08 | UJAT38 | 37,78533, -4,06897 | 3,78±0,65 |
| UJAT16 | 37,87636, -3,89471 | 19,59±0,76 | UJAT39 | 37,75346, -4,19628 | 3,16±0,70 |
| UJAT17 | 37,88675, -3,96269 | 6,56±0,67 | UJAT40 | 37,76987, -4,06145 | 11,01±1,32 |
| UJAT18 | 37,9186, -4,05763 | 22,9±2,09 | UJAE1 | 37,76012, -3,68814 | 4,62±0,14 |
| UJAT19 | 37,88808, -4,1464 | 12,13±0,75 | UJAE2 | 37,62714, -3,97657 | 10,73±2,87 |
| UJAT20 | 37,68911, -4,25509 | 4,5±0,17 | UJAE3 | 37,83586, -4,19137 | 12,45±2,06 |
| UJAT21 | 37,62739, -4,15368 | 2,15±0,63 | UJAE4 | 37,80463, -3,52356 | 2,89±0,01 |
| UJAT22 | 37,64109, -3,9189 | 14,08±0,56 | UJAE5 | 37,7494, -4,19809 | 7,42±1,30 |
| UJAT23 | 37,57295, -3,91932 | 129,08±29,52 | | | |

4.2 - Aislamiento bacteriano y purificación

Las bacterias tolerantes a metales pesados se aislaron de las muestras de suelo mediante el método de dilución en agar usando placas de agar Luria Bertani (Scharlau, Barcelona, España) suplementadas con diferentes concentraciones de metales. Los metales pesados analizados fueron cobre (Cu), cadmio (Cd), plomo (Pb), zinc (Zn) y níquel (Ni).

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizaron soluciones madre de sales metálicas (1 M) preparados previamente en agua destilada, se esterilizaron por filtración a través de membrana de filtro (0,22 μm) y se almacenaron a 4 °C.

Las muestras de suelo (0,5 g) se inocularon en 4,5 ml de medio LB y se incubaron 1 hora a 30 °C con agitación (180 rpm). A continuación, las muestras se dejaron sedimentar durante 30 minutos y las diluciones de la fase líquida se extendieron en placas sobre agar LB suplementado con las sales metálicas, en concentraciones previamente descritas por Içgen y Yilmaz (2014): $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (1200 mg/l), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (450 mg/l), $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (395 mg/l), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (825 mg/l) y $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (187.5 mg/l). Todos los medios se ajustaron a pH 7. Después de la incubación durante 3-5 días a 30 °C, se seleccionaron colonias con diferentes características morfológicas de cada placa para su posterior análisis. Un panel de 778 aislados se purificó en placas de agar LB. También se obtuvieron stocks de cada cepa que se almacenaron en glicerol al 20% y se conservaron a -80 °C.

4.3 - Estimación de la tolerancia de las cepas aisladas a los metales

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de los metales para cada aislado se determinó por el método de dilución en placa. Se adicionaron las distintas sales metálicas al medio LB base, a concentraciones finales de 0,5 a 32 mM y los medios se ajustaron a pH 7 con NaOH (10 N). Los cultivos se inocularon en placas de agar LB adicionadas con las distintas concentraciones de sales y se incubaron durante 3-5 días a 30 °C. La concentración más baja de cada sal que impidió el crecimiento bacteriano se consideró como concentración mínima inhibitoria. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Con el propósito de definir la tolerancia al metal, aquellos aislados que crecieron en presencia de concentraciones 1 mM de Cu, Cd, Pb, Zn y Ni se consideraron tolerantes, de acuerdo con el estándar de Nieto *et al.* (1987).

De los 778 aislados iniciales, 96 fueron seleccionados como tolerantes a metales pesados, en función de las MICs más elevadas detectadas frente a los distintos metales.

4.4 - Identificación bacteriana

Las cepas se identificaron mediante secuenciación del ADNr 16S. El ADN se obtuvo con un kit de extracción de ADN genómico bacteriano (GenElute™, Sigma-Aldrich, Madrid). El ADNr 16S se amplificó por PCR usando el cebador 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3' y el cebador inverso 5'-CNCGTCCTTCATCGCT-3' (Eurofins Genomics, España) (Abriouel *et al.*, 2005). El programa de PCR utilizado fue de desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización a 94

°C durante 1 minuto, anillado a 55 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1 minuto y extensión final a 72 °C durante 5 minutos. La PCR se realizó en un Mastercycler® pro Thermal Cycler (Eppendorf, EE.UU.). Los productos de PCR obtenidos se purificaron, utilizando el kit de purificación de PCR ExoProStartm (GE Healthcare, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y fueron posteriormente secuenciados (Sistemas Genómicos, Valencia, España). Las dos secuencias de ARNr 16S se alinearon y se compararon en el GenBank utilizando las herramientas de búsqueda de alineación local básica de NCBI BLAST.

4.5 - Determinación de la resistencia a antibióticos

El patrón de resistencia a los antibióticos de las 96 cepas seleccionadas se determinó mediante el método de difusión en disco descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) en Agar Mueller-Hinton (Scharlau) y empleando los siguientes discos de antibióticos: ampicilina (10 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg) y trimetoprim/sulfametoxazol 1:19 (cotrimoxazol) (25 µg), todos de Oxoid (Reino Unido). Los resultados se expresaron como el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en milímetros. Los aislados se clasificaron como resistentes (R), intermedios (I) o sensibles (S) según los estándares del CLSI (2015).

4.6 - Detección de genes de resistencia antimicrobiana

La presencia de genes para bombas de exporte se determinó mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores y las condiciones específicas de PCR descritas previamente por Swick *et al.* (2011) para los genes *acrB* y *mdfA* (Tabla 3). Los genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (QACs) *qacA/B* se detectaron mediante amplificación por PCR de acuerdo con el protocolo de Noguchi *et al.* (2005). La presencia de los genes *qacE* y *qacEΔ1* y su asociación con los integrones de Clase I se investigó según lo descrito por Chuanchuen *et al.* (2007), utilizando el cebador *qacEF* en combinación con los cebadores inversos *qacER* y *sulR*, respectivamente. El gen de la integrasa *intI1* se detectó de acuerdo con el procedimiento descrito por Chuanchuen *et al.* (2007) y el gen *oqxA*, codificante de la bomba de exporte multi-fármacos OqxAB, según Hansen *et al.* (2007). También se investigaron los genes de resistencia frente a sulfonamidas y trimetoprim *dfrA12* y *dfrA15* (Sáenz *et al.*, 2004) y frente a aminoglucósidos *aac(6_-)Ie-aph(2_-)Ia* (Vakulenko *et al.*, 2003).

Los genes de resistencia a beta-lactamasas investigados fueron *bla_{TEM}* (Sáenz *et al.*, 2004), *bla_{PSE}* (Chiu *et al.*, 2006), *bla_{CTX-M}* y *bla_{CTX-M-2}* (Bertrand *et al.*, 2006). Los genes de resistencia a la tetraciclina *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* y *tet(G)* también fueron ensayados, según el protocolo descrito por Ng *et al.* (2001).

Tabla 3. Cebadores usados en PCR para determinar genes de resistencia a antibióticos.

| Gen | Cebador (5' - 3') | Amplicón (bp) |
|------------------------------|--|---------------|
| <i>tetA</i> | GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG | 210 |
| <i>tetB</i> | TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG | 659 |
| <i>tetC</i> | CTTGAGAGCCTTCAACCCAG ATGGTCGTCATCTACCTGCC | 418 |
| <i>tetD</i> | AAACCATTACGGCATTCTGC GACCGGATACACCATCCATC | 787 |
| <i>tetE</i> | AAACCACATCCTCCATACGC AAATAGGCCACAACCGTCAG | 278 |
| <i>tetG</i> | GCTCGGTGGTATCTCTGCTC AGCAACAGAATCGGGAACAC | 468 |
| <i>bla</i> _{CTX-M} | RATGTGCAGYACCAGTAA CGCRATATCRTTGGTGGTG | 540 |
| <i>bla</i> _{CTX-M2} | ATGATGACTCAGAGCATTTCG TCAGAAACCGTGGGTTAC | 876-859 |

| | | |
|---------------------------|--|------|
| <i>bla</i> _{PSE} | GGCAATCACACTCGATGATGCGT GGCTCAATACGGTCTAGACGAGT | 156 |
| <i>Bla</i> _{TEM} | ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAACGAAAAC | 1150 |

4.7 - Genes de tolerancia a metales pesados

El gen para la oxidasa de cobre que se encuentra en los operones plasmídicos *pcoABCDRSE* (descrito en *E. coli*) y *copABCDRS* (*P. syringae*) se investigó utilizando los cebadores (Tabla 4) y las condiciones de PCR descritas para *pcoA/copA* por Badar *et al.* (2014). Los genes adicionales implicados en la tolerancia al cobre *copB*, *copC*, *copD* (Kamika y Momba, 2013; Badar *et al.*, 2014), *pcoD* (bomba de membrana interna de cobre) del grupo *pcoABCDRSE* descrito en bacterias Gram-negativas (Mourão *et al.*, 2015), y el gen *pcoR*, de la proteína represora de unión al ADN (Chihomvu *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 1992) también fueron analizados.

El operón cromosómico *cueAR*, que codifica para la ATPasa de tipo P1 y la proteína reguladora de tipo MerR implicada en la homeostasis del cobre descrita en *Pseudomonas putida*, se investigó según Adaikkalam y Swarup (2002), así como el gen del grupo *tcrYAZB* descrito en *Enterococcus* [*tcrB* (ATPasa de exporte de cobre)] (Mourão *et al.*, 2015; Hasman *et al.*, 2006). Dos genes del grupo *silCFBAPRSE*, *silA* (antipuerto de protón/ catión de membrana interna para plata) y *silE* (proteína de unión a metal

periplásmico para plata/cobre) (Silver, 2003), *arsB* (bomba transmembrana de arsenito), (García Fernández *et al.*, 2007) así como otros genes relacionados con la tolerancia a metales, como *merA* (reductasa mercúrica) (Liebert *et al.*, 1997) y *terF* (proteína implicada en la tolerancia a telurito) también fueron investigados (García Fernández *et al.*, 2007).

El gen de tolerancia al cromo *chrB* se detectó según Nies *et al.* (1990) y Chihomvu *et al.* (2015) y el gen *czcD* involucrado en la regulación del sistema de eflujo CZC (zinc, cobalto y cadmio) según lo descrito por Medardus *et al.*, 2014. Los genes *smtAB* de tolerancia al plomo se detectaron según Naik *et al.* (2012), y *pbrA* que participa también en la tolerancia al plomo según (Borremans *et al.*, 2001). El operón *ncc* se amplificó como un fragmento que abarcaba el gen *nccA* (Abou-Shanab *et al.*, 2007). Por último, el gen *zntA* descrito en *E. coli* (ATPasa de tipo P translocante Zn (II)) se detectó de acuerdo con Rensing *et al.* (1997)

Tabla 4. Cebadores usados en PCR para determinar genes de tolerancia a metales.

| Gen | Cebador (5' - 3') | Amplicon (bp) |
|-------------|-----------------------|---------------|
| <i>pcoA</i> | CGTCTCGACGAACTTTCCTG | 1791 |
| | GGACTTCACGAAACATTCCC | |
| <i>pcoR</i> | CAGGTCGTTACCTGCAGCAG | 636 |
| | CTCTGATCTCCAGGACATATC | |
| <i>chrB</i> | GTCGTTAGCTTGCCAACATC | 450 |
| | CGGAAAGCAAGATGTCGATCG | |

| | | |
|------------------|--|------|
| <i>pcoA/copA</i> | TCCATACACTGGCACGGCAT TGGATCGGGTGAGTCATCAT | 1331 |
| <i>copB</i> | TCCACGTTTGTTCACTGCTC AGTCGGCTGTATTGCCGTAG | 900 |
| <i>copC</i> | TGTTGAACCGCACAAAGTTTC GGTAATCGGGTGGGTATCG | 350 |
| <i>copD</i> | TTTCGCGCTGTATACCGATT CTTCCATCTCAGGGGACAGT | 893 |
| <i>cueAR</i> | CGTCTAGAGCGATGGCAAGGTCAAGTT CCTCTAGAGCTGTTCCACGGCATTCCC | 3600 |
| <i>pcoA</i> | CTCGCGGATGTCAGTGGCTACACCT ATCCGGAAGGTCAGCACCGTCCATAGAC | 504 |
| <i>pcoD</i> | CTGGCCACACTTGCCTGGGG CACGCTACGGCGCCCAGAAT | 500 |
| <i>trcB</i> | CATCACGGTAGCTTTAAGGAGATTTTC ATAGAGGACTCCGCCACCATTG | 663 |
| <i>silA</i> | GCAAGACCGGTAAAGCAGAG CCTGCCAGTACAGGAACCAT | 936 |
| <i>silE</i> | GTTTCGTCATGGTYTCATGAGC GTACTYCCCCGGACATCACTAATT | 264 |

| | | |
|-------------|---|------|
| <i>merA</i> | ACCATCGGCGGCACCTGCGT ACCATCGTCAGGTAGGGGAAC | 1238 |
| <i>arsB</i> | GGCAGATAGTGTGGAATGCG AGTGAAAGACAGACGAAGCG | 1136 |
| <i>terF</i> | ATGCAGGCTCAAGGAATCGC TTCATCGATCCACGGTCTG | 894 |

4.8 - Estadística

El procedimiento de análisis de correspondencia se realizó para definir las relaciones entre las tolerancias de los metales y los distintos grupos bacterianos identificados, así como entre la tolerancia a metales y la resistencia a los antibióticos. Las distancias de chi-cuadrado se calcularon para mostrar las contribuciones de cada celda al estadístico de chi-cuadrado utilizado para probar la hipótesis de independencia entre las clasificaciones de fila y columna (R: un lenguaje y entorno para la computación estadística. R Foundation for Statistical Computing, R Core Team, 2017, Viena, Austria).

El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para analizar las relaciones entre la concentración de cobre en muestras de suelo y la tolerancia al cobre en microorganismos aislados, así como entre diferentes tolerancias de metales (Statgraphics Centurion XVI, versión 16.2.04, 2013, EE. UU.).

El Odds Ratio (OR) y el IC exacto del 95% se usaron para determinar la asociación entre los determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados y la resistencia fenotípica a los antibióticos o la presencia de genes de resistencia a los antibióticos. Un $OR \leq 1$ indica correlación negativa y $OR > 1$ correlación positiva.

La prueba analizó las diferencias en la prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos, la presencia de genes de tolerancia a metales pesados y los determinantes genéticos para la resistencia a los antibióticos. La prueba de Fisher se utilizó para determinar la importancia de la asociación entre los determinantes genéticos de la tolerancia a metales pesados y la resistencia fenotípica a los antibióticos o la presencia de genes de resistencia a los antibióticos siendo significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1 - Tolerancia a metales pesados

Se aislaron un total de 780 bacterias a partir de muestras de tierra de campos agrícolas de olivos en placas de agar Luria Bertani suplementadas con diferentes concentraciones de metales. El 45% de los aislados crecieron en medios que contenían sulfato de cobre a una concentración 16 mM, y el 11% se desarrollaron con una concentración 32 mM de la sal de cobre. El 54% de los aislados creció a una concentración de sulfato de zinc 12 mM (y el 23% incluso a 32 mM), y el 62% en presencia de nitrato de plomo 12 mM. La tolerancia al cadmio y al níquel tuvo una menor incidencia, de modo que el 14% de las cepas se desarrollaron a una concentración 8 mM de nitrato de cadmio y el 4% a 8 mM de sulfato de níquel. Sin embargo, todos los aislados probados fueron inhibidos por la sal de níquel a 16 mM o la de cadmio a 12 mM.

Se seleccionaron 595 aislados en función de su alta tolerancia a metales pesados y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada metal para cada cepa. Los resultados se muestran en la Tabla 5. El 2,57% de los aislados mostraron una MIC ≥ 16 mM para el cobre y el 19% necesitaron una concentración de 32 mM de sulfato de cobre para ser inhibidos. También se encontraron altas tolerancias al zinc (37% de los aislados con MIC ≥ 16 mM) y al plomo (62% de los aislados con MIC ≥ 16 mM). Por el contrario, todos los aislados fueron inhibidos a una concentración 12 mM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ y solo el 3% de los aislados pudieron crecer a una concentración ≥ 12 mM de NiSO_4 .

Tabla 5. MICs para metales pesados expresado en porcentajes de las 595 cepas aisladas.

| MIC (mM) | CuSO ₄ 5H ₂ O | ZnSO ₄ 7H ₂ O | Pb(NO ₃) ₂ | Cd(NO ₃) ₂ 4H ₂ O | NiSO ₄ 6H ₂ O |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|
| 0,5 | | | | 3,03 | |
| 1 | | | | 53,95 | |
| 2 | 4,03 | 33,11 | | 19,33 | |
| 4 | 9,92 | 19,50 | 2,02 | 9,24 | 44,37 |
| 8 | 10,76 | 9,75 | 14,62 | 14,45 | 52,44 |
| 12 | 18,66 | | 21,01 | | 0,17 |
| 16 | 27,56 | 30,76 | 61,34 | | 3,03 |
| 20 | 10,42 | | | | |
| 32 | 18,66 | 6,89 | 1,01 | | |

5.2 - Concentración de cobre en muestras de suelo

La concentración de cobre en muestras de suelo se muestra en la Tabla 2. Los resultados oscilaron entre 2 y 129 mg/kg, aunque el 58% de las muestras mostraron concentraciones de cobre por debajo de 10 mg/kg. El 26.7% de las muestras de suelo presentaron concentraciones entre 10 y 20 mg/kg y el 11% entre 20 y 40 mg/kg. Sí destacaron dos muestras, T36 y T23, que mostraron concentraciones de cobre significativamente más altas, de 78 y 129 mg/kg, respectivamente.

El análisis de componentes principales llevado a cabo para determinar posibles asociaciones entre la concentración de cobre en los suelos y la tolerancia a este metal en bacterias aisladas mostró una fuerte correlación ($r = 0.744$) entre ambos parámetros,

lo que sugiere un efecto directo de la presión selectiva de cobre en el desarrollo de tolerancia a este metal en bacterias aisladas de estos suelos.

5.3 - Identificación de cepas tolerantes a metales

Se seleccionaron 96 cepas a partir del panel inicial de 595 aislados, en base a su mayor tolerancia a metales. Los aislados bacterianos se identificaron mediante secuenciación de ADNr 16S. La mayoría de ellos fueron identificados como género *Pseudomonas* (36.5%), seguidos por el género *Bacillus* (24%) y *Chryseobacterium* (20%). El 6% de los aislados se identificaron como *Variovorax*, el 4% como *Stenotrophomonas*, el 2% como *Serratia* o *Burkholderia*. Los géneros *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Janthinobacterium* y *Sphingobacterium* representaron el 1% de los aislados resistentes cada uno (Figura 8a).

El análisis de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de metales para cada uno de estos aislados seleccionados (Figura 8b) mostró que el 59% de los aislados seleccionados presentaban una MIC ≥ 16 mM para cobre. El 85% de los aislados eran tolerantes al níquel y el 99% tolerantes al plomo (MICs ≥ 8 mM). También se encontró una alta tolerancia a Zn, con el 75% de los aislados que mostraron una MIC ≥ 8 mM para este metal. El 43% de los aislados fueron inhibidos por cadmio a una concentración 1 mM y porcentajes más bajos fueron inhibidos a concentraciones de 2, 4 y 8 mM (16, 15 y 25% respectivamente).

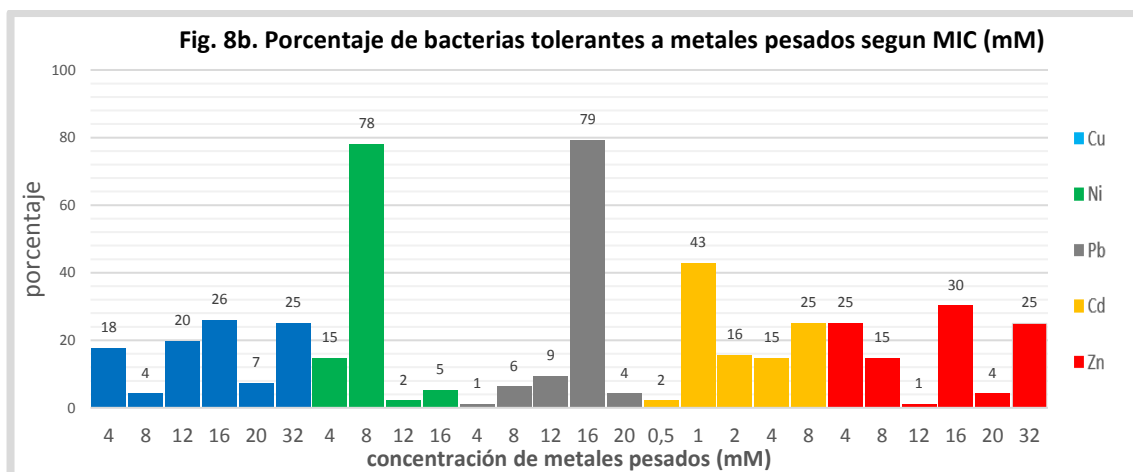
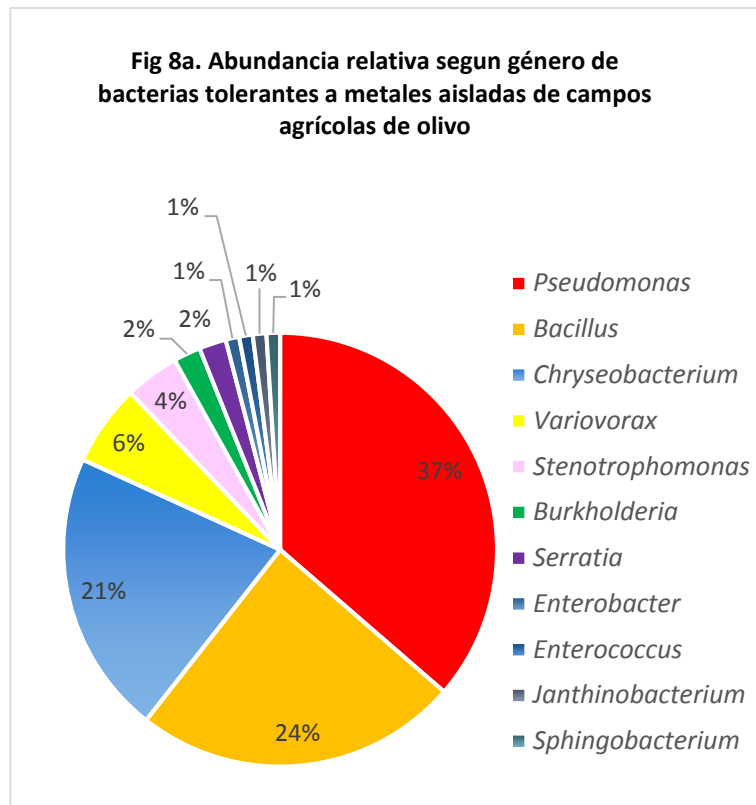


Figura 8. a) Abundancia relativa de géneros entre los 96 aislados seleccionados. b) Porcentaje de aislados seleccionados tolerantes a metales pesados según MIC (mM).

El análisis de la tolerancia al cobre según género se muestra en la Figura 9. Más del 25% de los aislados presentaron una MIC de 32 mM para cobre, de los cuales el 22,3% se identificaron como *Pseudomonas*. Este género también representa un

porcentaje importante del 9.6% de los aislados que muestran MIC de 20 mM para sulfato de cobre. El 25% de los aislados que presentó una MIC de 16 mM para cobre, fue identificado como género *Bacillus*, predominante en este nivel de tolerancia (13,8%), seguido de *Pseudomonas* (5,3%) y *Variovorax* (4,3%). La mayoría de los aislados que muestran una MIC de 12 mM para cobre pertenecen al género *Chryseobacterium* (8,5%), seguidos de *Stenotrophomonas* (4,3%) y *Bacillus* o *Variovorax* (2,1% cada uno).

Por otro lado, todos los aislados que mostraban MIC de 8 mM para sulfato de cobre se identificaron como género *Bacillus*, mientras que el género *Chryseobacterium* seguido de *Bacillus* y *Pseudomonas* presentaron una menor tolerancia al cobre (MIC de 4 mM).

El análisis de componentes principales (PCA) para determinar las posibles asociaciones entre la tolerancia al cobre y la tolerancia a otros metales entre las cepas seleccionadas se muestra en la Figura 10. El PCA no detectó correlación entre la tolerancia al cobre y la mayor tolerancia al níquel, cadmio o zinc. Sólo se encontraron correlaciones débiles entre la tolerancia al cobre y una mayor tolerancia al plomo ($r=0,218$). También encontramos correlaciones débiles entre la tolerancia al cadmio y el aumento de la tolerancia al plomo, níquel y zinc ($r=0,228$, $r=0,235$ y $r=0,292$, respectivamente), así como entre el aumento de las tolerancias al zinc y al plomo o al níquel ($r=0,253$ y $r= 0.324$, respectivamente), lo que sugiere una posible tolerancia cruzada después de una presión selectiva con cobre en la tolerancia a estos pares de metales.



Figura 9. Distribución de la tolerancia al cobre (mM) según géneros identificados.

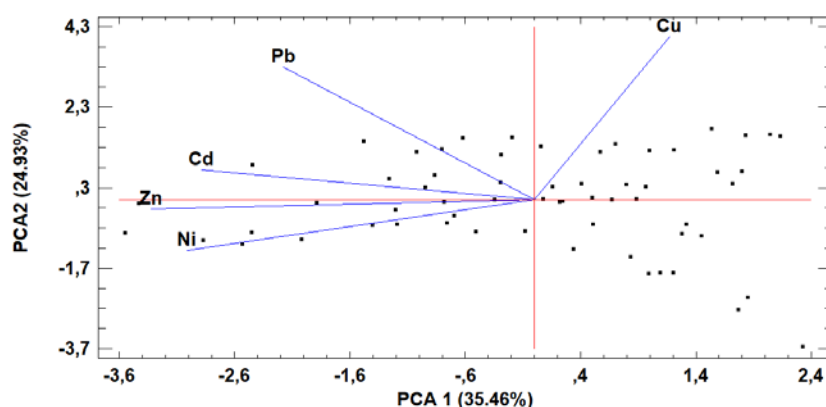


Figura 10. Análisis de componentes principales de bacterias tolerantes a metales pesados. Se muestra el porcentaje de variación explicado por cada eje, y la relación es significativa ($P=0,05$). Cu: cobre; Pb: plomo; Cd: cadmio; Zn: zinc; Ni: níquel.

La Tabla 6 muestra los valores de tolerancia a las sales de metales pesados y la resistencia a los antibióticos de los 96 aislados bacterianos seleccionados de los suelos. El análisis de correspondencia de la tolerancia al cobre y la resistencia a los antibióticos (Figura 11) muestra altas correlaciones entre la tolerancia a este metal y la resistencia a

antibióticos clínicamente importantes como la ampicilina (Fig. 11a), vancomicina (Fig. 11b), eritromicina (Fig. 11c) y la combinación trimetoprim/sulfametoxazol (Fig. 11e). Más del 75% de las cepas seleccionadas resistentes al cobre también fueron resistentes a la vancomicina, el 50% a la ampicilina y el 40% a la eritromicina o a la combinación trimetoprim/sulfametoxazol ($p < 0,05$), mostrando fuertes correlaciones. Más del 35% de todas estas cepas resistentes a los antibióticos mostraron una MIC de 20 a 32 mM para sulfato de cobre y se identificaron como género *Pseudomonas*.

El 30% de las cepas tolerantes al cobre también fueron resistentes a ceftazidima (Fig. 11d) o gentamicina (Fig. 11f). Por otro lado, la mayoría de las cepas tolerantes al cobre fueron inhibidas por ciprofloxacino (Fig. 11g).

Tabla 6. Tolerancia a metales pesados y resistencia a antibióticos en aislados bacterianos seleccionados de suelos olivar.

| Aislado | MIC (mM) | | | | | Fenotipo de resistencia |
|--|-------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------|
| | CuSO ₄ | ZnSO ₄ | Pb(NO ₃) ₂ | Cd(NO ₃) ₂ | NiSO ₄ | |
| <i>Bacillus cereus</i> (T22Pb3) | 16 | 16 | 16 | 1 | 8 | CAZ, SXT, AMP |
| <i>Bacillus endophyticus</i> (T37Ni3) | 4 | 4 | 12 | 1 | 8 | CAZ |
| <i>Bacillus fordii</i> (T11Ni1) | 4 | 4 | 12 | 1 | 8 | CAZ |
| <i>Bacillus fordii</i> (T18Ni1) | 8 | 4 | 8 | 1 | 8 | CAZ, SXT |
| <i>Bacillus megaterium</i> (T1Ni2) | 4 | 4 | 8 | 1 | 8 | CAZ |
| <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> (T4Ni3) | 8 | 4 | 8 | 1 | 8 | CAZ, VA |
| <i>Bacillus</i> sp. (T17Ni3) | 12 | 20 | 12 | 2 | 8 | CAZ |
| <i>Bacillus</i> sp. (T19Pb3) | 16 | 16 | 16 | 1 | 8 | AMP |

| | | | | | | |
|---|----|----|----|---|----|-----------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. (T20Pb2) | 8 | 8 | 16 | 1 | 8 | AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T21Zn1) | 12 | 32 | 20 | 1 | 8 | CAZ |
| <i>Bacillus</i> sp. (T28Pb3) | 16 | 16 | 16 | 2 | 8 | CAZ, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T11Pb1) | 16 | 16 | 16 | 1 | 8 | CAZ, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T12Pb1) | 16 | 16 | 16 | 1 | 8 | CAZ, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T13Ni2) | 16 | 16 | 16 | 1 | 8 | CAZ, SXT, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T13Pb1) | 16 | 16 | 16 | 2 | 8 | CAZ, SXT, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T14Pb1) | 16 | 16 | 16 | 2 | 8 | CAZ, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T26Ni3) | 16 | 16 | 16 | 1 | 8 | CAZ |
| <i>Bacillus</i> sp. (T26Pb2) | 16 | 16 | 16 | 1 | 8 | CAZ, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T37Ni2) | 4 | 8 | 12 | 1 | 8 | CAZ |
| <i>Bacillus</i> sp. (T8Pb1) | 16 | 16 | 16 | 2 | 8 | CAZ, SXT, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T9Ni2) | 16 | 16 | 16 | 2 | 8 | CAZ, SXT, AMP |
| <i>Bacillus</i> sp. (T9Pb1) | 16 | 16 | 16 | 2 | 8 | CAZ, SXT, AMP |
| <i>Burkholderia zhejiangensis</i> (T37Cd2) | 32 | 8 | 16 | 8 | 12 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Burkholderia zhejiangensis</i> (T38Zn3) | 32 | 32 | 16 | 1 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Chryseobacterium formosense</i> (T11Zn1) | 12 | 32 | 16 | 1 | 8 | CN |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T14Cd2) | 4 | 8 | 16 | 4 | 8 | CN, CAZ, SXT, AMP |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T4Ni2) | 4 | 12 | 20 | 1 | 8 | CN, CAZ |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T6Pb1) | 4 | 20 | 16 | 8 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T6Zn3) | 12 | 32 | 16 | 4 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium hispalense</i> (T3Zn3) | 12 | 32 | 16 | 8 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (E5Zn1) | 12 | 32 | 16 | 8 | 8 | CN, CAZ, SXT, VA, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T18Cd1) | 4 | 16 | 16 | 8 | 8 | CN, CAZ, VA |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T30Zn1) | 12 | 32 | 16 | 8 | 8 | CN, AMP |

| | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|----|----------------------|
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T31Zn1) | 12 | 32 | 16 | 4 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T37Cd3) | 4 | 16 | 16 | 8 | 12 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T3Cd1) | 4 | 16 | 16 | 8 | 8 | AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T3Ni2) | 4 | 8 | 16 | 8 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T3Zn2) | 12 | 32 | 20 | 8 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T4Cd1) | 4 | 16 | 16 | 8 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T5Cd1) | 4 | 16 | 16 | 8 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T5Ni3) | 4 | 20 | 16 | 8 | 8 | E, AMP |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T6Cd1) | 4 | 16 | 16 | 8 | 8 | CN, AMP |
| <i>Chryseobacterium piperi</i> (T8Cd1) | 4 | 16 | 16 | 4 | 8 | VA, AMP |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> (E1Pb3) | 16 | 8 | 16 | 1 | 8 | E, VA, AMP |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (T26Zn2) | 12 | 32 | 16 | 1 | 8 | E, CN, CAZ, CIP |
| <i>Flavobacterium johnsoniae</i> (E1Zn1) | 12 | 32 | 16 | 2 | 16 | CN, CAZ, VA |
| <i>Janthinobacterium lividum</i> (T25Cd3) | 26 | 8 | 16 | 2 | 8 | CAZ, SXT |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (E1Cu3) | 20 | 4 | 16 | 1 | 8 | E, CIP, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T11Cd1) | 32 | 4 | 16 | 4 | 8 | E, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T17Pb1) | 16 | 4 | 16 | 1 | 4 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T23Cu2) | 32 | 4 | 16 | 0.5 | 4 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T34Cu2) | 32 | 4 | 16 | 1 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T5Cu2) | 32 | 8 | 16 | 1 | 8 | E, CN, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T6Cu1) | 32 | 4 | 16 | 1 | 4 | SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T7Ni1) | 32 | 20 | 12 | 4 | 8 | VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (E5Zn2) | 32 | 32 | 16 | 4 | 8 | E, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (E5Zn3) | 32 | 32 | 16 | 8 | 8 | E, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T12Cu1) | 32 | 16 | 16 | 1 | 8 | E, VA, AMP |

| | | | | | | |
|---|----|----|----|---|---|----------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T15Cd1) | 32 | 16 | 16 | 8 | 8 | E, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T25Cu3) | 20 | 8 | 16 | 1 | 4 | E, CIP, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T25Ni3) | 20 | 8 | 12 | 1 | 8 | SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T31Cd3) | 26 | 16 | 16 | 8 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T32Cd3) | 32 | 16 | 16 | 8 | 8 | CAZ, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T35Cd3) | 32 | 16 | 16 | 8 | 8 | E, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T35Cu2) | 32 | 8 | 16 | 1 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T3Ni3) | 16 | 4 | 16 | 1 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T5Cd2) | 32 | 8 | 16 | 8 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T7Cd3) | 32 | 16 | 16 | 8 | 8 | E, CAZ, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas lutea</i> (E3Cu2) | 20 | 4 | 16 | 1 | 4 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas lutea</i> (T8Ni2) | 4 | 4 | 4 | 1 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas putida</i> (T1Cu3) | 32 | 8 | 16 | 1 | 4 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T15Cu3) | 32 | 4 | 16 | 1 | 4 | E, CIP, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T15Ni1) | 16 | 4 | 12 | 2 | 8 | SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T16Ni3) | 16 | 4 | 12 | 1 | 8 | SXT, VA |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T18Cu3) | 20 | 4 | 16 | 1 | 4 | E, CIP, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T19Cu2) | 20 | 4 | 16 | 2 | 8 | E, CAZ, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T22Cu1) | 20 | 16 | 16 | 2 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T24Cu3) | 32 | 4 | 16 | 1 | 4 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T24Ni1) | 8 | 4 | 8 | 1 | 8 | CAZ |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T28Cu2) | 32 | 4 | 16 | 1 | 8 | E, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T36Cu3) | 20 | 4 | 16 | 1 | 8 | E, CAZ, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T40Cd3) | 32 | 16 | 16 | 4 | 8 | E, CAZ, SXT, VA, AMP |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T7Cu2) | 32 | 4 | 16 | 4 | 4 | E, SXT, VA, AMP |

| | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|----|--------------------------|
| <i>Serratia proteamaculans</i> (T3Cd2) | 32 | 8 | 16 | 8 | 8 | VA, AMP |
| <i>Serratia proteamaculans</i> (T4Pb1) | 20 | 16 | 16 | 8 | 8 | VA, AMP |
| <i>Sphingobacterium paucimobilis</i> (T30Zn3) | 12 | 32 | 16 | 8 | 16 | E, CN |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T19Zn1) | 12 | 32 | 20 | 4 | 16 | E, CN, SXT, AMP |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T40Zn1) | 12 | 32 | 16 | 4 | 16 | VA, AMP |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (E1Zn3) | 12 | 32 | 16 | 0.5 | 4 | E |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (T31Zn2) | 12 | 32 | 16 | 1 | 8 | AMP |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (E4Zn1) | 16 | 32 | 16 | 4 | 4 | E, CN, CAZ, SXT, VA, AMP |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T18Zn2) | 12 | 32 | 8 | 2 | 4 | CN, CAZ, VA, AMP |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T23Zn2) | 12 | 32 | 16 | 4 | 8 | CN, CAZ, SXT, VA, AMP |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T32Zn2) | 16 | 32 | 16 | 2 | 16 | E, CN, CAZ, VA, AMP |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T32Zn3) | 16 | 32 | 16 | 2 | 8 | CN, CAZ, VA, AMP |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T7Zn1) | 16 | 32 | 8 | 4 | 4 | E, CN, CAZ, VA, AMP |

AMP, ampicilina; CAZ, ceftazidima; CIP, ciprofloxacino; CN, gentamicina; E, eritromicina; SXT, trimetoprim/solfametoxazol; VA, vancomicina. MIC, concentración mínima inhibitoria.

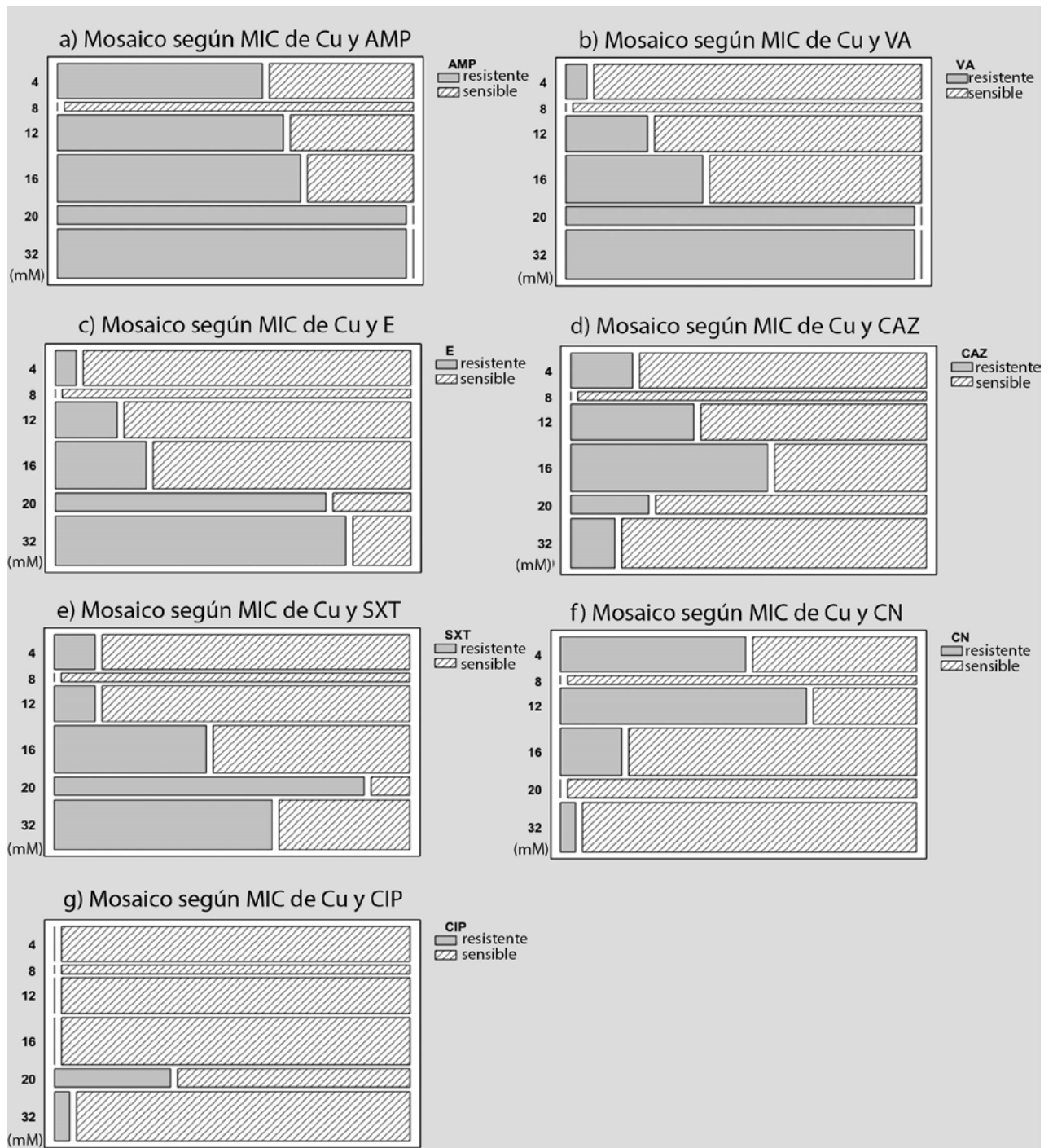


Figura 11. Distribución de la resistencia a los antibióticos la resistencia al cobre (mM). Ampicilina (a), vancomicina (b), eritromicina (c), ceftazidima (d), trimetoprim/sulfametoxazol (e), gentamicina (f) y ciprofloxacino (g).

5.4 - Determinantes genéticos que codifican la tolerancia a metales pesados y la resistencia a los antibióticos

El estudio de los determinantes genéticos que codifican la tolerancia a los metales (Tabla 7) mostró que el 67,7% de las muestras analizadas portaba al menos uno de los genes estudiados. El análisis arrojó resultados positivos para el gen *copA* que codifica para la oxidasa multicobre (26,04% de los aislados seleccionados), el gen de la proteína represora de unión al ADN *pcoR* (21,88%), la bomba de membrana interna de cobre *pcoD* (10,42%), la proteína de membrana externa *copB* (2,08%), la proteína de unión al cobre periplásmica *copC* (3,13%) y el gen para la oxidasa multicobre *pcoA* (3,13% de los aislados seleccionados).

El gen de unión a metales que codifica para la metalotioneína *smtA* (9,38%), el gen *czcD*, involucrado en la regulación del sistema de exporte de zinc, cobalto y cadmio, (13,54%) y el gen de la ATPasa tipo P *zntA*, implicado en la tolerancia a cadmio, plomo y zinc, (39,58%) también se encontraron en las cepas tolerantes a los metales seleccionados.

El gen de ATPasa de exporte de cobre *tcuB* se encontró en el 2,08% de los aislados seleccionados, así como el gen de la proteína periplásmica de unión de plata/cobre *silE* (2,08%). El gen de mercurio reductasa *merA* (1,04%) y el gen de resistencia al cromato de zinc *chrB* (8,33%) también se encontraron en aislados del suelo. Los restantes genes de tolerancia a metales investigados no fueron detectados.

Con respecto a los genes de resistencia a antibióticos específicos, el 58,3% de las cepas presentaron al menos uno de los genes de resistencia tipo β -lactamasa estudiados (*bla_{TEM}*, *bla_{PSE}*, *bla_{CTX-M}* y *bla_{CTX-M-2}*). El gen que se detectó con mayor frecuencia fue

*bla*_{CTX-M} (en el 30,21% de los aislados) seguido de *bla*_{TEM}, en el 15,63%. También se encontraron genes de resistencia a la tetraciclina del grupo *tetABCDEG* en el 53,1% de los aislados seleccionados. El más frecuente fue el gen *tetA*, presente en el 36,46% de las muestras analizadas y *tetC*, en el 16,67% de los aislados. Los genes que codifican bombas de exporte también se detectaron en aislados resistentes, aunque su prevalencia fue menor: El gen *acrB*, involucrado en la expresión de la bomba de exporte AcrAB-TolC, fue el determinante más frecuentemente detectado, con un 37,5% de cepas positivas. Los genes *qacA/B* y *qacE*^[1] que confieren resistencia a los compuestos de amonio cuaternario (QACs) y a algunos colorantes se detectaron en el 8,3% y 3,1% de los aislados respectivamente.

El gen de la integrasa *intl1* se encontró en el 14,5% de los aislados y el 7,3% de las cepas presentaron el gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* que codifica la enzima modificadora de aminoglucósidos bi-funcional. Solo el 3,1% de los aislados fueron positivos para el gen *dfrA12*, que codifica para resistencia a sulfonamida y trimetoprim.

Tabla 7. Determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados, resistencia a antibióticos y bombas de exporte inespecíficas y fenotipos de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas del suelo de olivares.

| Cepa | Fenotipo de resistencia a antibióticos | Determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados | Determinantes genéticos de bombas de exporte | Determinantes genéticos de resistencia a antibióticos |
|--|--|---|--|--|
| <i>Bacillus cereus</i> (T22Pb3) | CAZ, SXT, AMP | - | <i>acrB</i> | - |
| <i>Bacillus endophyticus</i> (T37Ni3) | CAZ | - | - | <i>tetA, tetC</i> |
| <i>Bacillus fordii</i> (T11Ni1) | CAZ | <i>chrB</i> | - | - |
| <i>Bacillus fordii</i> (T18Ni1) | CAZ, SXT | <i>pcoR, copA</i> | <i>qacA/B</i> | - |
| <i>Bacillus megaterium</i> (T1Ni2) | CAZ | <i>pcoR, chrB, copA</i> | <i>intl1</i> | <i>tetA</i> |
| <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> (T4Ni3) | CAZ, VA | <i>copA</i> | <i>intl1</i> | <i>tetA, tetC, bla_{PSE}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T17Ni3) | CAZ | - | - | <i>tetB, bla_{PSE}, bla_{TEM}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T19Pb3) | AMP | - | - | <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T20Pb2) | AMP | <i>pcoD</i> | <i>acrB, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> | <i>tetA, tetE</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T21Zn1) | CAZ | <i>pcoA</i> | - | <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T28Pb3) | CAZ, AMP | - | <i>acrB</i> | <i>bla_{TEM}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T11Pb1) | CAZ, AMP | - | <i>acrB</i> | <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T12Pb1) | CAZ, AMP | - | <i>acrB</i> | - |
| <i>Bacillus</i> sp. (T13Ni2) | CAZ, SXT, AMP | - | <i>intl1</i> | <i>tetG, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T13Pb1) | CAZ, SXT, AMP | - | <i>acrB</i> | <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T14Pb1) | CAZ, AMP | - | <i>intl1</i> | - |
| <i>Bacillus</i> sp. (T26Ni3) | CAZ | <i>smtA</i> | <i>qacA/B, acrB, intl1, dfrA12</i> | <i>tetG, bla_{CTX-M}, bla_{CTX-M2}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T26Pb2) | CAZ, AMP | - | <i>acrB</i> | - |
| <i>Bacillus</i> sp. (T37Ni2) | CAZ | - | <i>dfrA12</i> | - |

| | | | | |
|---|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|--|
| <i>Bacillus</i> sp. (T8Pb1) | CAZ, SXT, AMP | - | <i>acrB</i> | - |
| <i>Bacillus</i> sp. (T9Ni2) | CAZ, SXT, AMP | - | - | <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{CTX-M2}</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. (T9Pb1) | CAZ, SXT, AMP | - | - | - |
| <i>Burkholderia zhejiangensis</i> (T37Cd2) | E, SXT, VA, AMP | <i>zntA</i> | - | <i>tetA</i> |
| <i>Burkholderia zhejiangensis</i> (T38Zn3) | E, SXT, VA, AMP | <i>zntA</i> | <i>qacA/B</i> | <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium formosense</i> (T11Zn1) | CN | - | - | <i>tetA</i> , <i>tetC</i> , <i>bla_{TEM}</i> |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T14Cd2) | CN, CAZ, SXT, AMP | - | - | <i>tetC</i> |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T4Ni2) | CN, CAZ | - | - | <i>tetA</i> , <i>tetC</i> , <i>bla_{CTX-M2}</i> |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T6Pb1) | CN, AMP | <i>pcoR</i> , <i>zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>tetC</i> , <i>tetG</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium gleum</i> (T6Zn3) | CN, AMP | <i>pcoR</i> , <i>copB</i> | - | <i>tetG</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{CTX-M2}</i> |
| <i>Chryseobacterium hispalense</i> (T3Zn3) | CN, AMP | - | - | <i>tetA</i> , <i>tetC</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (E5Zn1) | CN, CAZ, SXT, VA, AMP | <i>zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>tetD</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T18Cd1) | CN, CAZ, VA | - | <i>qacA/B</i> , <i>acrB</i> | <i>tetA</i> , <i>bla_{CTX-M2}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T30Zn1) | CN, AMP | - | <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> | <i>tetA</i> , <i>tetC</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T31Zn1) | CN, AMP | <i>pcoR</i> , <i>zntA</i> | - | <i>tetC</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T37Cd3) | CN, AMP | <i>pcoR</i> | - | - |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T3Cd1) | AMP | - | <i>acrB</i> | <i>tetA</i> , <i>tetC</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T3Ni2) | CN, AMP | <i>pcoR</i> | - | <i>tetA</i> , <i>tetD</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T3Zn2) | CN, AMP | - | - | <i>tetA</i> , <i>tetE</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T4Cd1) | CN, AMP | <i>pco</i> | <i>acrB</i> | <i>bla_{CTX-M}</i> |

| | | | | |
|--|----------------------|---|--|--|
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T5Cd1) | CN, AMP | <i>pcoR</i> | - | <i>tetA, tetC, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T5Ni3) | E, AMP | <i>pcoR</i> | - | <i>tetA, tetC, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium oranimense</i> (T6Cd1) | CN, AMP | - | <i>acrB, intl1</i> | <i>tetA, tetC, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Chryseobacterium piperi</i> (T8Cd1) | VA, AMP | - | <i>qacA/B, acrB</i> | <i>tetA, tetC, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> (E1Pb3) | E, VA, AMP | <i>copB, copC, pcoD, tcrB, merA, zntA</i> | - | <i>bla_{TEM}</i> |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (T26Zn2) | E, CN, CAZ, CIP | <i>pcoR</i> | - | <i>tetA, tetB, tetD, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Flavobacterium johnsoniae</i> (E1Zn1) | CN, CAZ, VA | - | <i>acrB, qacED1</i> | <i>tetA, tetC</i> |
| <i>Janthinobacterium lividum</i> (T25Cd3) | CAZ, SXT | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T15Ni1) | SXT, VA, AMP | <i>copA, zntA</i> | <i>dfrA12</i> | <i>tetE,</i> |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T16Ni3) | SXT, VA | - | - | <i>tetA, bla_{PSE}</i> |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (E1Cu3) | E, CIP, SXT, VA, AMP | <i>copA, pcoA, czc, smtA, zntA</i> | <i>acrB, intl1</i> | <i>tetA, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T11Cd1) | E, VA, AMP | - | - | <i>tetA, bla_{CTX-M2}, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T17Pb1) | E, SXT, VA, AMP, | <i>copA, zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>tetA, tetG, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T23Cu2) | E, SXT, VA, AMP | <i>copA, zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>tetA</i> |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T34Cu2) | E, SXT, VA, AMP | <i>copA, zntA</i> | <i>acrB, intl1, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> | - |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T5Cu2) | E, CN, SXT, VA, AMP | <i>copA, smtA</i> | <i>acrB</i> | <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T6Cu1) | SXT, VA, AMP | <i>czc, smtA, zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>tetA</i> |
| <i>Pseudomonas entomophila</i> (T7Ni1) | VA, AMP | <i>copA, pcoD, czc, smtA, zntA</i> | - | - |

| | | | | |
|---|----------------------|------------------------------|-------------------------------------|---|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (E5Zn2) | E, VA, AMP | <i>copA, pcoD, zntA</i> | <i>aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia</i> | <i>tetG, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (E5Zn3) | E, VA, AMP | <i>copA, pcoD, zntA</i> | <i>acrB, aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia</i> | <i>bla_{CTX-M}, bla_{PSE}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T12Cu1) | E, VA, AMP | <i>pcoR, pcoD, zntA</i> | - | <i>bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T15Cd1) | E, VA, AMP | <i>chrB, czc, zntA</i> | - | <i>tetA</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T25Cu3) | E, CIP, SXT, VA, AMP | <i>zntA</i> | - | <i>tetB, bla_{CTX-M2}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T25Ni3) | SXT, VA, AMP | <i>czc</i> | <i>qacA/B</i> | <i>tetG</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T31Cd3) | E, SXT, VA, AMP | <i>czc, zntA</i> | <i>qacA/B</i> | <i>tetD, bla_{PSE}, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T32Cd3) | CAZ, VA, AMP | <i>pcoR, copA, zntA</i> | - | <i>tet</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T35Cd3) | E, VA, AMP | <i>copA, czc, zntA</i> | - | <i>tetA, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T35Cu2) | E, SXT, VA, AMP | <i>copA, pcoD, smtA</i> | <i>acrB</i> | <i>tetA,</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T3Ni3) | E, SXT, VA, AMP | <i>copA, pcoD,</i> | - | <i>tetA, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T5Cd2) | E, SXT, VA, AMP | <i>pcoR, chrB, czc, zntA</i> | - | <i>tetA, bla_{CTX-M}, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> (T7Cd3) | E, CAZ, SXT, VA, AMP | <i>pcoR, zntA</i> | - | <i>tetA</i> |
| <i>Pseudomonas lutea</i> (E3Cu2) | E, SXT, VA, AMP | <i>czc, zntA</i> | <i>intl1</i> | - |
| <i>Pseudomonas lutea</i> (T8Ni2) | E, SXT, VA, AMP | - | - | - |
| <i>Pseudomonas putida</i> (T1Cu3) | E, SXT, VA, AMP | <i>copA, copC, czc, smtA</i> | <i>acrB, intl1</i> | <i>tetE, bla_{CTX-M}, bla_{CTX-M2}, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T15Cu3) | E, CIP, SXT, VA, AMP | <i>copA, zntA</i> | <i>aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia</i> | <i>tetE, bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T18Cu3) | E, CIP, SXT, VA, AMP | <i>copA, silE, zntA</i> | <i>acrB, intl1</i> | <i>tetA, bla_{CTX-M2}</i> |

| | | | | |
|---|-----------------------------|--|------------------------------------|---|
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T19Cu2) | E, CAZ, SXT, VA, AMP | <i>copA, silE</i> | <i>acrB, int11</i> | - |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T22Cu1) | E, SXT, VA, AMP | <i>pcoR, pcoD, zntA</i> | - | <i>tetD, tetE, tetG, bla_{CTX-M}</i> |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T24Cu3) | E, SXT, VA, AMP | <i>pcoR, zntA</i> | <i>acrB, int11</i> | - |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T24Ni1) | CAZ | <i>pcoR, copA</i> | <i>acrB</i> | - |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T28Cu2) | E, SXT, VA, AMP | <i>chrB, copA, zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>bla_{TEM}</i> |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T36Cu3) | E, CAZ, SXT, VA, AMP | <i>chrB, copA, czc, smtA, zntA</i> | <i>int11</i> | - |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T40Cd3) | E, CAZ, SXT, VA, AMP | <i>czc, zntA</i> | <i>qacA/B, acrB</i> | <i>tetB, bla_{CTX-M2}</i> |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (T7Cu2) | E, SXT, VA, AMP | <i>pcoD, zntA</i> | <i>acrB</i> | - |
| <i>Serratia proteamaculans</i> (T3Cd2) | VA, AMP | <i>zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>tetB, tetE, tetG</i> |
| <i>Serratia proteamaculans</i> (T4Pb1) | VA, AMP | <i>pcoR, copA</i> | <i>aac(6')-Ie- aph(2'')-Ia</i> | <i>tetB, tetG, bla_{CTX-M}, bla_{PSE}</i> |
| <i>Sphingobacterium paucimobilis</i> (T30Zn3) | E, CN | <i>pcoR, copA, copC</i> | - | <i>tetC, tetG, bla_{PSE}</i> |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T19Zn1) | E, CN, SXT, AMP | <i>zntA</i> | - | <i>bla_{TEM}</i> |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (T40Zn1) | VA, AMP | <i>zntA</i> | <i>acrB</i> | <i>bla_{TEM}</i> |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (E1Zn3) | E | <i>pcoA</i> | - | - |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (T31Zn2) | AMP | <i>zntA</i> | - | - |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (E4Zn1) | E, CN, CAZ, SXT, VA, AMP | <i>pcoR</i> | <i>acrB</i> | <i>tetA</i> |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T18Zn2) | CN, CAZ, VA, AMP | <i>czc, smtA, zntA</i> | - | <i>tetB</i> |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T23Zn2) | CN, CAZ, SXXT, VA, AMP | <i>zntA</i> | - | - |

| | | | | |
|---|------------------------|-------------|---|-------------|
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T32Zn2) | E, CN, CAZ, VA, AMP | <i>chrB</i> | - | <i>tetE</i> |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T32Zn3) | CN, CAZ, VA, AMP | <i>chrB</i> | - | - |
| <i>Variovorax paradoxus</i> (T7Zn1) | E, CN, CAZ, VA, AMP | - | - | <i>tetA</i> |

5.5 - Asociación entre la presencia de determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados y la resistencia a antibióticos

El análisis de los resultados de los aislados seleccionados muestra asociaciones significativas entre la presencia de genes pertenecientes al grupo *copABC* y la resistencia a la eritromicina ($p=0,002$), gentamicina ($p=0,023$), ceftazidima ($p=0,023$) y vancomicina ($p=0,001$) (Figura 12).

La presencia del gen *czc*, involucrado en la regulación del sistema de exporte de zinc, cobalto y cadmio, también muestra asociación con la resistencia a la eritromicina ($p=0,034$), ampicilina ($p=0,018$), vancomicina ($p<0,0001$) y trimetoprim/sulfametoxazol ($p=0,028$) y la detección del gen para la ATPasa tipo P *zntA* se asocia con resistencias elevadas a eritromicina ($p<0,0001$), gentamicina ($p=0,037$), vancomicina ($p<0,0001$), trimetoprim/sulfametoxazol ($p=0,001$) y ampicilina ($p<0,0001$).

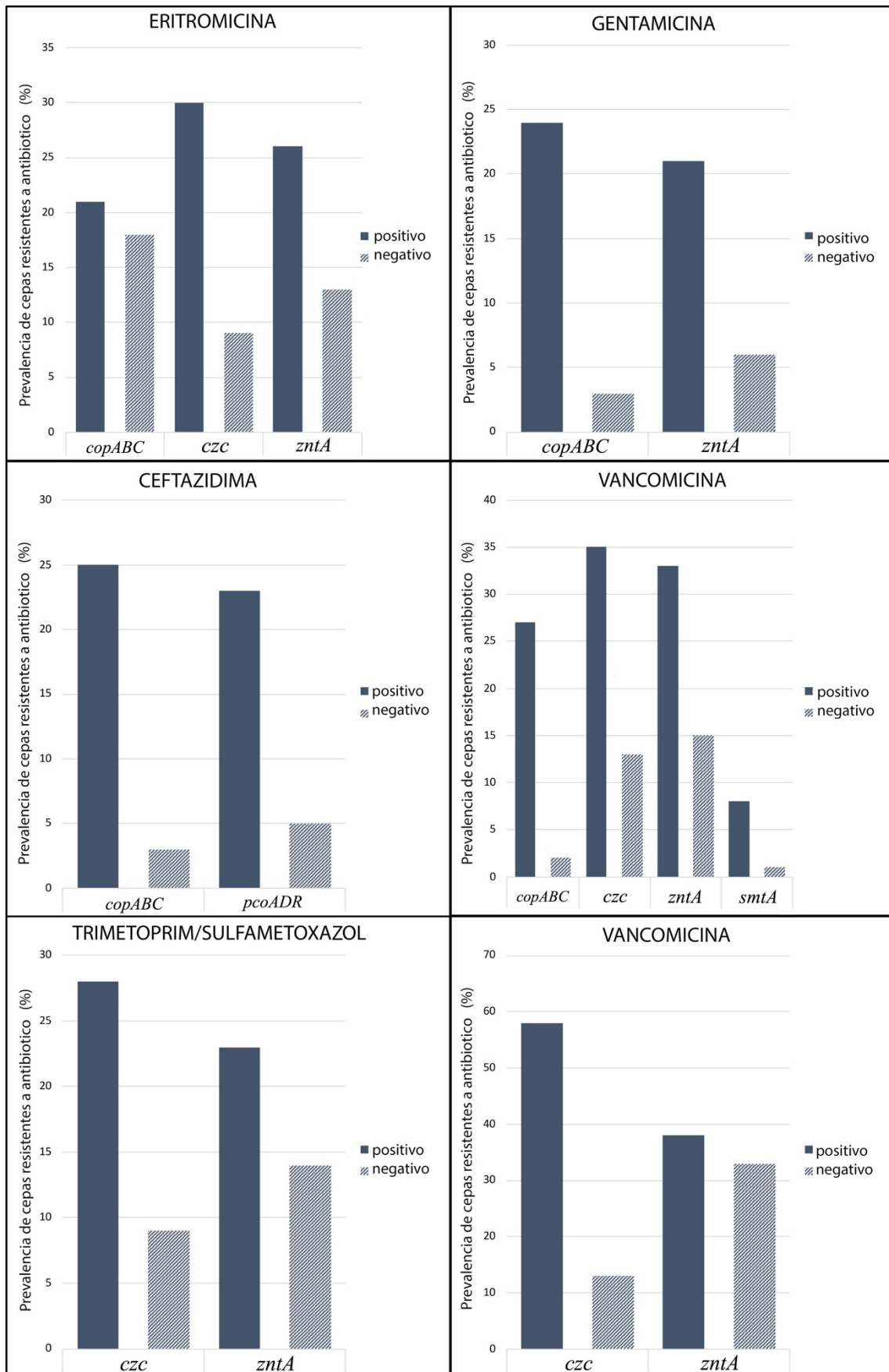


Figura 12. Asociación entre presencia de determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados y porcentajes de cepas resistentes a antibióticos.

Los genes *pcoA*, *pcoD* y *pcoR* del operón *pcoABCDRSE*, involucrados en la regulación del cobre, muestran correlación con la resistencia a la ceftazidima ($p=0,023$), y el gen *smtA* involucrado en la resistencia al plomo revela una correlación significativa con la resistencia a la vancomicina ($p=0,031$).

5.6 - Asociación entre los determinantes genéticos de tolerancia a metales pesados y de resistencia a los antibióticos

El análisis de los determinantes genéticos involucrados en la tolerancia de metales y aquellos implicados en la resistencia a antibióticos (Figura 13) también muestra asociaciones significativas entre los genes *zntA* y *tetC* ($p = 0,023$) así como entre *copA* y *tetB/tetC/tetD* ($p=0,041$) o *bla_{PSE}/bla_{TEM}* ($p=0,01$), y entre *copC* y *bla_{PSE}/bla_{TEM}* ($p=0,008$). También se encontraron asociaciones significativas entre la presencia de *pcoR* y *bla_{CTX-M}* ($p = 0,031$), lo que sugiere una posible co-selección entre la tolerancia al cobre y la resistencia a beta-lactámicos y tetraciclinas.

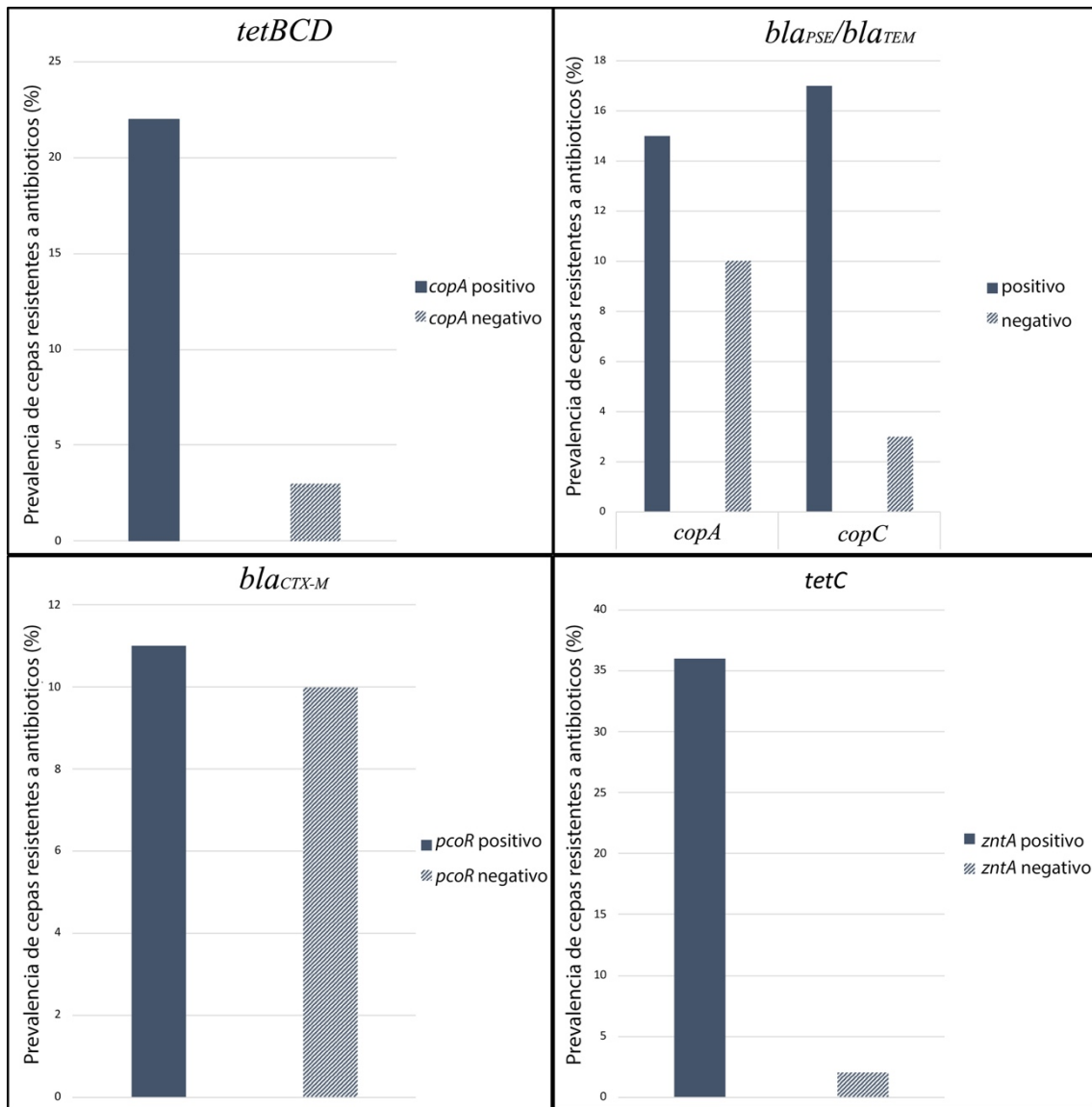


Figura 13. Asociación entre determinantes genéticos de resistencia a metales pesados y fenotipo de resistencia a antibióticos en porcentaje.

DISCUSIÓN

6 - DISCUSIÓN

Los compuestos derivados del cobre son utilizados generalmente en campos de cultivo de olivos en la provincia de Jaén para prevenir o tratar infecciones por hongos. Debido a su persistencia prolongada en el suelo (Berg *et al.*, 2005), el cobre puede considerarse un agente de presión selectiva a largo plazo que contribuye al desarrollo y mantenimiento de la resistencia a antimicrobianos en las cepas presentes en estos ecosistemas (Alonso *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2012).

Los metales pesados difunden frecuentemente de forma ubicua en los suelos debido a las prácticas agrícolas. Estos contaminantes son altamente estables además de resistentes a la degradación, incluso encontrándose en bajos niveles. Pueden persistir en el ambiente y permanecer estables durante períodos prolongados de tiempo de forma que pueden contribuir a la aparición y propagación de cepas resistentes a antimicrobianos debido a procesos de co-selección de elementos genéticos que codifican para la resistencia a ambos tipos de compuestos, denominándose a este proceso resistencia cruzada o co-regulación (Yu *et al.*, 2017).

Incluso la presencia de cantidades muy bajas de antibióticos de forma individual y / o compuestos tóxicos en el ambiente puede seleccionar bacterias portadoras de grandes plásmidos que confieren resistencia a diferentes antibióticos y tolerancia frente a metales pesados (Gullberg *et al.*, 2014). La co-resistencia de las bacterias a diversos desinfectantes y a los antibióticos se produce como resultado de la localización de los genes de resistencia a los primeros en plásmidos transmisibles y en regiones conservadas de integrones, cada uno de los cuales ha demostrado tener además múltiples genes de resistencia a antibióticos. Este proceso de selección indirecta se debe

a un acoplamiento de los mecanismos de resistencia contra ambos tipos de compuestos. Estos mecanismos pueden ser acoplados fisiológicamente (resistencia cruzada) y genéticamente (resistencia conjunta). La resistencia cruzada implica mecanismos que proporcionan tolerancia a más de un agente antimicrobiano (Seiler y Berendonk, 2012), como pueden ser: reducción en la permeabilidad de la envoltura celular, regulación de las bombas de flujo de salida, modificación en una diana o adquisición de una enzima neutralizante impidiendo la acción de diferentes agentes. Por el contrario, la resistencia conjunta se define como la unión de dos o más genes de resistencia ligados genéticamente, lo que significa que los genes responsables de dos o más resistencias se encuentran uno al lado del otro en un trasposón (Chapman, 2003). Surge a partir de estos estudios previos la necesidad de realizar una investigación sistemática del potencial co-selectivo de metales y biocidas, ya que podría ser la base para la transmisión de genes de resistencia antimicrobiana a través de fronteras ecológicas y, en última instancia, incluso a patógenos humanos (Fard *et al.*, 2011).

Estudios previos sobre el impacto de la contaminación de cobre a largo plazo de suelos agrícolas en el desarrollo de resistencia a los antibióticos muestran una relación clara entre el aumento de los niveles de cobre y la aparición de genes de resistencia a los antibióticos (ARGs) (Hu *et al.*, 2016; Poole, 2017). Un estudio similar en suelos de Escocia también mostró la existencia de relación entre los niveles de cobre y la aparición de ARGs (Knapp *et al.*, 2011). Incluso en niveles relativamente bajos, se ha demostrado que la presencia de cobre en los suelos se asocia positivamente con ciertos ARGs (Knapp *et al.*, 2017), lo que indica que los niveles sustancialmente subtóxicos de este metal pueden aumentar la prevalencia de ARGs.

El objetivo principal de este estudio ha sido evaluar la presencia de bacterias tolerantes a metales pesados en suelos de olivar tratados de forma prolongada con derivados de cobre, identificar las cepas con elevada tolerancia a metales pesados y evaluar su resistencia a antibióticos, así como la presencia de determinantes genéticos que confieren tolerancia a metales y/o resistencia a los antibióticos. También se ha investigado la coexistencia de genes de tolerancia a los metales y resistencia a los antibióticos, con el fin de identificar combinaciones de genes en los que el potencial de co-selección sea particularmente alto.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayoría de los suelos agrícolas en campos de cultivo de olivos presentan bajas concentraciones de cobre, con un promedio de 15 mg/kg (lo que equivaldría a aproximadamente entre 0.2 y 0.3 mM de cobre) y solo dos muestras de suelos tenían concentraciones superiores de 78 mg/kg (*ca.* 1.1 a 1.4 mM) y 129 mg/kg (*ca.* 1.8 a 2.4 mM). Sin embargo, los porcentajes de aislados con concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de cobre ≥ 16 mM fueron muy altos, alcanzando incluso los 32 mM en algunas cepas. Estos resultados podrían ser interpretados de varias maneras. Por ejemplo, la exposición a altas concentraciones de cobre podría seleccionar bacterias con mayor tolerancia al cobre que luego persistirían en el suelo después de que la concentración de cobre disminuyera. En segundo lugar, si el cobre no se distribuye de manera homogénea en el suelo, la presencia de microambientes (como las partículas del suelo) con una mayor concentración de cobre podría ejercer una presión selectiva para la tolerancia al cobre en las cepas que se desarrollen en dichas zonas. La adición repetida de cobre, además, causa mayores niveles de tolerancia a otros compuestos que una aplicación aislada, lo que sugiere que la exposición repetida mitiga la toxicidad y promueve la selección de bacterias

tolerantes (Liu *et al.*, 2017), por lo que también es posible que la exposición repetida a bajas concentraciones de cobre provoque altos niveles de tolerancia a este compuesto, sin necesidad de que en momentos puntuales se alcancen altos niveles del metal en los suelos tratados.

Además, porcentajes relativamente altos de bacterias aisladas de los suelos de olivar también presentaron altos niveles de tolerancia a otros metales pesados como zinc y plomo, y en porcentajes más bajos también a cadmio y níquel. Estos resultados también sugerirían poblaciones naturales de bacterias tolerantes a metales en los suelos y mecanismos comunes de tolerancia a estos metales, como los que se basan en la adsorción y/o inmovilización no específica del metal.

Numerosos estudios muestran una correlación entre la persistencia de cobre y zinc en muestras ambientales y la presencia de poblaciones microbianas tolerantes a metales y resistentes a antibióticos, incluso una mayor prevalencia de genes/organismos resistentes a antibióticos en ambientes contaminados con metales en comparación con ambientes libres de metales (Lin *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2016; Knapp *et al.*, 2017; Poole, 2017). Además, el impacto del cobre en la resistencia a antimicrobianos es mayor en comparación con el de otros metales (Knapp *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013).

Silver y Ji (1994) también han descrito tolerancia combinada a metales pesados, así como la co-selección de tolerancia a metales y antibióticos en bacterias procedentes de muestras contaminadas con metales pesados (Berg *et al.*, 2005; Máthé *et al.*, 2012; Gullberg *et al.*, 2014), probablemente como resultado de la actividad de transferencia de genes entre bacterias de diferentes fuentes.

Los resultados del presente estudio revelan también la presencia de fenotipos de resistencia a diversos antibióticos en bacterias tolerantes a metales aisladas de suelos de olivar. En particular, un alto porcentaje de aislados con CMI alta para cobre también resultaron ser resistentes a antibióticos como ampicilina, vancomicina, eritromicina y trimetoprim-sulfometoxazol. Estudios previos corroboran la resistencia a antimicrobianos en poblaciones bacterianas de los suelos y su asociación con la tolerancia a metales pesados en la producción agrícola (Berg *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017).

Nuestros resultados también indican una alta prevalencia de *Pseudomonas* tolerantes a metales en los suelos de cultivo de olivar, como se describió anteriormente en otros suelos contaminados con metales pesados (Matyar, 2012; Malik y Aleem, 2011), así como su asociación con la resistencia a antibióticos.

La lista de patógenos de prioridad global (PPL global) de bacterias resistentes a los antibióticos recientemente publicada por la Organización Mundial de la Salud, señala a los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, concretamente las especies *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos dentro del grupo de Prioridad 1, que se considera crítico para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos.

Las cepas de *Pseudomonas* resistentes a múltiples fármacos se están diseminando a nivel global (Maravić *et al.*, 2011) y pueden causar infecciones con tasas de mortalidad elevadas en personas susceptibles (Streeter y Katouli, 2016). Las bacterias ambientales pueden estar implicadas en infecciones oportunistas que pueden tener consecuencias fatales si las bacterias son resistentes a los antibióticos (independientemente de si poseen resistencia intrínseca o adquirida). Cabe destacar

que uno de los aislados obtenidos en el presente estudio, identificado como *Chryseobacterium oranimense* (E5Zn1), muestra resistencia frente a cinco antibióticos: gentamicina (CN), ceftazidima (CAZ), sulfametoxazol (SXT), vancomicina (VA) y ampicilina (AMP), así como otros nueve aislados, identificados como pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Varios metales pesados como cobre, plata, arsénico, antimonio, cobalto, níquel, cadmio, hierro, zinc, mercurio y algunos biocidas del grupo de los derivados del amonio cuaternario (QACs) han sido descritos previamente como co-selectores potenciales para cepas resistentes a sulfonamidas, betalactámicos, anfenicoles, tetraciclinas y aminoglucósidos (Cavaco *et al.*, 2011; Gillings *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2015; Skurnik *et al.*, 2010; Sütterlin *et al.*, 2014).

En este estudio, describimos bacterias resistentes tanto a metales pesados como a antibióticos aislados de suelos de olivar tratados con cobre en los que se encontraron asociaciones significativas entre la presencia del cluster *copABC* involucrado en la tolerancia del cobre y la resistencia a la ceftazidima, la gentamicina, la eritromicina y la vancomicina. Los genes *pcoA*, *pcoD* y *pcoR* del operón *pcoABCDRSE*, involucrados en la regulación del cobre, también muestran correlación con la resistencia a la ceftazidima.

La presencia de los genes *czc*, involucrados en la regulación del sistema de exporte de zinc, cobalto y cadmio y el gen *zntA* de la ATPasa tipo P, también se asocian con la resistencia a cuatro antibióticos diferentes comúnmente utilizados en la clínica, y el gen *smtA*, involucrado en la resistencia a plomo, se correlaciona con la resistencia a la vancomicina. Existe una creciente evidencia de que el cobre y el zinc favorecen el desarrollo de la resistencia a los antibióticos en las bacterias expuestas a estos metales,

debido a la selección de elementos genéticos presentes en genes de resistencia a metales y a antibióticos (Poole, 2017).

El gen *zntA* que codifica para la ATPasa de tipo P fue el determinante genético de tolerancia a metales detectado con mayor frecuencia entre los aislados seleccionados, seguido por el gen *copA* de la oxidasa transmitida por el plásmido multicobre, el gen *pcoR* de la proteína represora de unión al ADN, el gen *czcD* involucrado en la regulación del sistema de exporte de zinc, cobalto y cadmio, y la proteína de membrana interna de cobre *pcoD*. El gen *smtA* de la metalotioneína de unión al metal y el gen *chrB* de resistencia al cromato de zinc también se detectaron entre el 8-9% de las cepas, lo que pone de manifiesto que las bacterias del suelo acumulan diferentes genes de tolerancia a metales con relativa frecuencia.

Los genes de resistencia para β -lactamasas y tetraciclinas también se encontraron frecuentemente en los aislados seleccionados, así como los genes que codifican para bombas de exporte, aunque su prevalencia fue menor, con excepción del gen *acrB*, involucrado en la expresión de la bomba de exporte AcrAB-TolC, que se encontró en un 37,5% de los aislados.

El análisis de los determinantes genéticos involucrados en la tolerancia a metales y la resistencia a antibióticos también muestra asociaciones significativas entre los genes *cop* y los determinantes genéticos que proporcionan resistencia a la tetraciclina y la β -lactamasa, así como entre el gen *pcoR*, que codifica una proteína represora de unión al ADN involucrada en la tolerancia al cobre, y genes que codifican para la producción de β -lactamasas. También se detectó una asociación significativa entre el gen *zntA*,

involucrado en la tolerancia al zinc y al cadmio, y genes para la resistencia a la tetraciclina.

Ya se habían descrito conexiones similares entre los genes de tolerancia específica a metales y los de resistencia a antimicrobianos, en concreto al estudiar genomas y plásmidos aislados de entornos múltiples para construir una red de coexistencia de genes de resistencia a antibióticos/metal/biocida basados en las secuencias de más de 2500 cromosomas y 4500 plásmidos (Pal *et al.*, 2015). Tanto los plásmidos como los genomas con genes de resistencia a biocidas o metales portaban con mayor frecuencia genes de resistencia a antibióticos en comparación con aquellos sin genes de resistencia a biocidas o metales. Además, ambos tipos de genes se encontraron juntos en genomas de varios orígenes ambientales, incluidos suelos contaminados. También se han aislado recientemente plásmidos que confieren tolerancia al cobre (*pco*), así como codificantes de β -lactamasas (*bla*_{CTX-M}) a partir de muestras de pollos, cerdos y patos en China (Fang *et al.*, 2016) y el gen que confiere resistencia a la colistina transferible (*mcr-1*) también se ha encontrado en aislados de bacterias tolerantes al cobre (Campos *et al.*, 2016), lo que apunta a que el cobre podría incluso seleccionar cepas resistentes a antibióticos de última generación, como la colistina.

Por otro lado, además de la resistencia conjunta y cruzada, los mecanismos de co-regulación también pueden promover este proceso de selección conjunta (Pal *et al.*, 2017), en el caso de que los genes de resistencia múltiple que confieren resistencia a diferentes compuestos tóxicos estén controlados por un gen regulador único. La proteína CzcR regula la expresión de la bomba de eflujo de salida CzcCBA, que confiere

resistencia al zinc, al cadmio y al cobalto. CzcR también co-regula la resistencia a los carbapenémicos, una clase de antibióticos de última generación, al reprimir la expresión de la porina OprD, la ruta de entrada de estos antibióticos a la célula bacteriana (Perron *et al.*, 2004).

Sin embargo, los mecanismos por los cuáles los diversos genes de tolerancia a metales influyen en la resistencia fenotípica a los antibióticos aún no se conocen lo suficiente y también es posible que diferentes especies bacterianas tengan capacidades inherentes para desarrollar tolerancia a metales pesados. Por tanto, la adición de metales pesados podría alterar la población de bacterias ambientales, lo que explicaría que la resistencia a los metales y los antibióticos podría encontrarse más comúnmente en los suelos tratados (Berg *et al.*, 2005). De hecho, la coexistencia de cloranfenicol y cobre a distintas concentraciones puede modificar significativamente la abundancia relativa de varios genes de resistencia a los antibióticos y el cambio en la estructura de la comunidad bacteriana parece ser la razón clave de los cambios de estos genes (Ma *et al.*, 2019).

Hay muchos estudios que apoyan la idea de la co-selección de resistencia a los antibióticos por parte de diversos metales, pero todavía faltan datos concluyentes que muestren un impacto clínico generalizado del uso de biocidas o metales en la resistencia a los antibióticos. Creemos que nuestros resultados pueden mejorar la comprensión de la genética de la co-selección y facilitar la evaluación de posibles escenarios de riesgo de diseminación de resistencia para reducir la propagación alarmante de genes de resistencia a antibióticos en el futuro. Investigaciones adicionales con metagenómica

podrían profundizar más en la identificación de entornos donde los riesgos para la co-selección son altos.

La eliminación de los antibióticos de la lista de aditivos para la alimentación animal como promotores del crecimiento fue un paso en la dirección correcta, pero se deben tomar medidas preventivas adicionales y también deben considerarse otros agentes antimicrobianos como los metales pesados, como posibles fuentes de aparición de cepas multi-resistentes.

CONCLUSIONES

7 - CONCLUSIONES

1. A pesar de que la mayoría de los suelos de olivar estudiados presentan bajas concentraciones de cobre, un alto porcentaje de las cepas aisladas presentan concentraciones mínimas inhibitorias elevadas para cobre, plomo y zinc, y en menor medida también para cadmio y níquel.
2. El análisis de distribución cruzada de tolerancia frente a distintos metales mostró que, en general, los aislados con elevada tolerancia frente a un metal no presentaron tolerancias mayores frente a otros metales.
3. Las cepas más frecuentes con elevada tolerancia frente al menos tres metales pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Chryseobacterium*, mientras que el resto de cepas pertenecen a los géneros *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Janthinobacterium* o *Sphingobacterium*.
4. De entre las cepas seleccionadas, las pertenecientes al género *Pseudomonas* mostraron las mayores tolerancias a cobre y a plomo, seguido por el género *Bacillus*, con elevadas tolerancias a cobre, zinc y plomo.
5. En las cepas tolerantes a múltiples metales, las mayores resistencias se encontraron frente a ampicilina seguida de vancomicina, sulfametoxazol, eritromicina, ceftazidima, gentamicina y ciprofloxacino, si bien esta distribución varía en función del género bacteriano.
6. Se han encontrado una correlación elevada entre la tolerancia a cobre en las cepas seleccionadas y la resistencia frente a antibióticos de gran importancia en

clínica humana, como ampicilina, vancomicina, eritromicina y la combinación sulfametoxazol/trimetoprim.

7. Un elevado porcentaje de las cepas seleccionadas portan al menos uno de los determinantes genéticos de tolerancia a metales investigados, destacando entre ellos los genes para tolerancia a cobre *copA*, *pcoR* y *pcoD*, así como otros genes de tolerancia a cobre, cobre y plata, zinc, cromo, cobalto, cadmio o plomo.
8. Se detectaron elevados porcentajes de cepas portadores de genes de resistencia a antibióticos, especialmente para las β -lactamasas *bla*_{TEM}, *bla*_{PSE}, *bla*_{CTX-M} o *bla*_{CTX-M-2} y tetraciclinas como *tetA*, *B*, *C*, *D*, *E* o *G*.
9. También se encontraron genes codificantes de bombas de exporte, enzimas implicadas en la resistencia a aminoglucósidos, sulfonamidas, trimetoprim o incluso biocidas derivados de amonio cuaternario, aunque su prevalencia fue menor.
10. Se han detectado asociaciones positivas significativas entre la presencia de genes de tolerancia a metales (como *cop*, *pcoA*, *pcoD* y *pcoR*, *czcD*, *zntA* y *smtA*) y la resistencia fenotípica a la mayoría de los antibióticos ensayados.
11. Se han encontrado igualmente asociaciones significativas entre la presencia de los genes *copA* y *tetB/tetC/tetD* o *bla*_{PSE}/*bla*_{TEM} así como entre *copC* y *bla*_{PSE}/*bla*_{TEM} y entre *pcoR* y *bla*_{CTX-M}, lo que sugiere una potencial co-selección de tolerancia a cobre y de resistencia a beta-lactámicos y tetraciclinas en las cepas estudiadas, a consecuencia de la exposición prolongada a cobre.
12. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la tolerancia a metales pesados es un factor que interviene en la co-selección de resistencia a antibióticos en suelos.

CONCLUDING REMARKS

1. Although most olive farm soils have low copper concentrations, a high percentage of bacterial isolates showed high minimum inhibitory concentrations for copper, lead and zinc, and to less extent to cadmium or nickel.
2. Analysis of the cross-distribution of MICs among different metals indicates that, in general terms, bacterial isolates with higher MICs for a given metal did not show higher MICs for the other metals.
3. The most frequent metal-tolerant strains with high tolerance to at least three of the metal salts analyzed belong to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Chryseobacterium*, while the rest of isolates belong to the genera *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Janthinobacterium* or *Sphingobacterium*.
4. *Pseudomonas* was the bacterial genus with higher tolerance to copper and lead, and also a high percentage of isolates from *Bacillus* group had high MICs for copper, zinc and lead.
5. Among the metal-tolerant isolates studied, antibiotic resistance was most frequent for ampicillin followed by vancomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, erythromycin, ceftazidime, gentamycin and ciprofloxacin, although the distribution was not homogeneous among genera.
6. High associations between tolerance to copper and resistance to clinically important antibiotics such as ampicillin, vancomycin, erythromycin and the combination trimethoprim/sulfamethoxazole have been found.

7. A high percentage of the strains carry at least one genetic determinant for metal tolerance, mainly those involved in copper tolerance as *copA*, *pcoR* and *pcoD*, as well as other genes involved in tolerance to copper, copper and silver, zinc, chrome, cobalt, cadmium or lead.
8. A high percentage of the strains carry antibiotic resistance genes, mainly the β -lactamase genes *bla*_{TEM}, *bla*_{PSE}, *bla*_{CTX-M} or *bla*_{CTX-M-2} and the tetracycline resistance genes *tetA*, *B*, *C*, *D*, *E* or *G*.
9. Genes coding for export pumps, aminoglycoside-modifying enzymes, sulphonamide, trimethoprim or even resistance to quaternary ammonium compounds (QACs) were also detected in resistant strains, although their prevalence was lower.
10. Significant associations were detected between metal tolerance genes (like *cop*, *pcoA*, *pcoD* and *pcoR*, *czcD*, *zntA* or *smtA*) and most of the phenotypic antibiotic resistances.
11. Significant associations were also found between *copA* and *tetB/tetC/tetD* or *bla*_{PSE}/*bla*_{TEM} genes, as well as between *copC* and *bla*_{PSE}/*bla*_{TEM} and between *pcoR* and *bla*_{CTX-M}, which suggest a potential co-selection of tolerance to copper and resistance to β -lactams and tetracyclines due to long-term Cu contamination in agricultural soils.
12. Our results support the hypothesis of heavy metal tolerance as an important factor involved in the co-selection of antibiotic resistance in soils.

Biobliografía

8 - Bibliografía

- Abou-Shanab, R., Van Berkum, P., & Angle, J. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, *68*(2), 360-367.
- Adaikkalam, V., & Swarup, S. (2002). Molecular characterization of an operon, *cueAR*, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida*. *Microbiology*, *148*(9), 2857-2867.
- Adriano, D. C. (2001). Arsenic. *Trace elements in terrestrial environments* (pp. 219-261): Springer.
- Agga, G. E., Arthur, T. M., Durso, L. M., Harhay, D. M., & Schmidt, J. W. (2015). Antimicrobial-resistant bacterial populations and antimicrobial resistance genes obtained from environments impacted by livestock and municipal waste. *PLoS One*, *10*(7), e0132586.
- Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Nomura, N., & Kawamura, F. (2006). Liberation of zinc-containing L31 (RpmE) from ribosomes by its paralogous gene product, YtiA, in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *188*(7), 2715-2720.
- Alloway, B. (1990). Heavy metals in soil: Glasgow: Blackie.
- Alonso, A., Sanchez, P., & Martinez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes: Minireview. *Environmental Microbiology*, *3*(1), 1-9.
- Amachawadi, R. G., Scott, H. M., Nitikanjana, S., Vinasco, J., Tokach, M. D., Dritz, S. S., . . . Nagaraja, T. G. (2015). Nasal carriage of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs exhibits dose-response to zinc supplementation. *Foodborne Pathogens and Disease*, *12*(2), 159-163.
- Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, *11*(12), 2970-2988.
- Andersson, D. I. (2006). The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current Opinion in Microbiology*, *9*(5), 461-465.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, *8*(4), 260.
- Andersson, D. I., & Levin, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(5), 489-493.

- Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 95-104.
- Archibald, F. S., & Duong, M.-N. (1984). Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*, 158(1), 1-8.
- Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., . . . Heberer, T. (2013). Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 993-1001.
- Badar, U., Ahmed, N., Beswick, A., Pattanapitpaisal, P., & Macaskie, L. (2000). Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. *Biotechnology Letters*, 22(10), 829-836.
- Badar, U., Ahmed, N., Shoeb, E., & Gadd, G. (2014). Identification of the pco operon in *Enterobacter* species isolated from contaminated soil. *International Journal of Advanced Research*, 2, 227-233.
- Bailey, S. E., Olin, T. J., Bricka, R. M., & Adrian, D. D. (1999). A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*, 33(11), 2469-2479.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14(4), 176-182.
- Baquero, F., Negri, M.-C., Morosini, M.-I., & Blázquez, J. (1998). Antibiotic-selective environments. *Clinical Infectious Diseases*, 27(Supplement_1), S5-S11.
- Beard, S. J., Hashim, R., Membrillo-Hernández, J., Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1997). Zinc (II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the zntA gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Molecular Microbiology*, 25(5), 883-891.
- Ben-Ami, R., Watson, C. C., Lewis, R. E., Albert, N. D., Arias, C. A., Raad, I. I., & Kontoyiannis, D. P. (2013). *Drosophila melanogaster* as a model to explore the effects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain type on virulence and response to linezolid treatment. *Microbial Pathogenesis*, 55, 16-20.
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., . . . Pons, M.-N. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310.
- Berg, J., Thorsen, M. K., Holm, P. E., Jensen, J., Nybroe, O., & Brandt, K. K. (2010). Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay. *Environmental Science and Technology*, 44(22), 8724-8728.

- Berg, J., Tom-Petersen, A., & Nybroe, O. (2005). Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letters in Applied Microbiology*, 40(2), 146-151.
- Bertrand, S., Weill, F.-X., Cloeckaert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., . . . Butaye, P. (2006). Clonal emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2897-2903.
- Beveridge, T., & Koval, S. (1981). Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 325-335.
- Beveridge, T., & Murray, R. (1976). Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1502-1518.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., . . . Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS One*, 7(4), e34953.
- Björkman, J., Nagaev, I., Berg, O., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2000). Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science*, 287(5457), 1479-1482.
- Blencowe, D. K., & Morby, A. P. (2003). Zn (II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 291-311.
- Bondarczuk, K., & Piotrowska-Seget, Z. (2013). Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology*, 29(6), 397-405.
- Borremans, B., Hobman, J., Provoost, A., Brown, N., & van Der Lelie, D. (2001). Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5651-5658.
- Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L., & Morby, A. P. (1999). ZntR is a Zn (II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31(3), 893-902.
- Brown, N. L., Barrett, S. R., Camakaris, J., Lee, B. T., & Rouch, D. A. (1995). Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Molecular Microbiology*, 17(6), 1153-1166.
- Brown, N. L., Rouch, D. A., & Lee, B. T. (1992). Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid*, 27(1), 41-51.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 145-163.

- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., & Helmann, J. D. (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Molecular Microbiology*, 29(1), 189-198.
- Byrne-Bailey, K., Gaze, W., Zhang, L., Kay, P., Boxall, A., Hawkey, P., & Wellington, E. (2011). Integron prevalence and diversity in manured soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 684-687.
- Calomiris, J. J., Armstrong, J. L., & Seidler, R. J. (1984). Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1238-1242.
- Calos, M. P., & Miller, J. H. (1980). Transposable elements. *Cell*, 20(3), 579-595.
- Campos, J., Cristino, L., Peixe, L., & Antunes, P. (2016). MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1, 4,[5], 12: i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*, 21(26), 30270.
- Cann, M. (2005). *Environmental chemistry*: MacMillan.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227-2238.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Aarestrup, F. M., Wagenaar, J. A., Graveland, H., Veldman, K., . . . Porrero, M. C. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Veterinary Microbiology*, 150(3-4), 344-348.
- Chamilos, G., Samonis, G., & P Kontoyiannis, D. (2011). *Drosophila melanogaster* as a model host for the study of microbial pathogenicity and the discovery of novel antimicrobial compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 17(13), 1246-1253.
- Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(4), 271-276.
- Chen, J.-Z., Tao, X.-C., Xu, J., Zhang, T., & Liu, Z.-L. (2005). Biosorption of lead, cadmium and mercury by immobilized *Microcystis aeruginosa* in a column. *Process Biochemistry*, 40(12), 3675-3679.
- Chen, X. C., Wang, Y. P., Lin, Q., Shi, J. Y., Wu, W. X., & Chen, Y. X. (2005). Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46(2), 101-107.
- Chen, Y.-T., Lauderdale, T.-L., Liao, T.-L., Shiau, Y.-R., Shu, H.-Y., Wu, K.-M., . . . Tsai, S.-F. (2007). Sequencing and comparative genomic analysis of pK29, a 269-kilobase conjugative plasmid encoding CMY-8 and CTX-M-3 β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 3004-3007.

- Chihomvu, P., Stegmann, P., & Pillay, M. (2015). Characterization and structure prediction of partial length protein sequences of pcoA, pcoR and chrB genes from heavy metal resistant bacteria from the Klip River, South Africa. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(4), 7352-7374.
- Chiu, C.-H., Su, L.-H., Chu, C.-H., Wang, M.-H., Yeh, C.-M., Weill, F.-X., & Chu, C. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(7), 2354-2358.
- Chou, A. Y., Archdeacon, J., & Kado, C. I. (1998). *Agrobacterium* transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene ipt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(9), 5293-5298.
- Chuanchuen, R., Khemtong, S., & Padungtod, P. (2007). Occurrence of qacE/qacED1 genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *38*, 855-862.
- Cobine, P., Wickramasinghe, W. A., Harrison, M. D., Weber, T., Solioz, M., & Dameron, C. T. (1999). The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper (I) to the CopY repressor. *FEBS Letters*, *445*(1), 27-30.
- Collard, J.-M., Corbisier, P., Diels, L., Dong, Q., Jeanthon, C., Mergeay, M., . . . Wuertz, S. (1994). Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *14*(4), 405-414.
- Collis, C. M., & Hall, R. M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, *39*(1), 155-162.
- Cooksey, D. A. (1993). Copper uptake and resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, *7*(1), 1-5.
- Cooksey, D. A. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *14*(4), 381-386.
- Cooper, R., Knowles, P., Brown, D., McGuirl, M., & Dooley, D. (1992). Evidence for copper and 3, 4, 6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal*, *288*(2), 337-340.
- Czárán, T. L., Hoekstra, R. F., & Pagie, L. (2002). Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(2), 786-790.

- D'costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, *311*(5759), 374-377.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417-433.
- Davis, I., Richards, H., & Mullany, P. (2005). Isolation of silver- and antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* from teeth. *Molecular Oral Microbiology*, *20*(3), 191-194.
- De Pina, K., Desjardin, V., Mandrand-Berthelot, M.-A., Giordano, G., & Wu, L.-F. (1999). Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *181*(2), 670-674.
- Debabov, D. (2013). Antibiotic resistance: Origins, mechanisms, approaches to counter. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *49*(8), 665-671.
- Degtyarenko, K. (2000). Bioinorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins. *Bioinformatics*, *16*(10), 851-864.
- Diels, L., Dong, Q., van der Lelie, D., Baeyens, W., & Mergeay, M. (1995). The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *Journal of Industrial Microbiology*, *14*(2), 142-153.
- Dietz, K.-J., Baier, M., & Krämer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants *Heavy metal stress in plants* (pp. 73-97): Springer.
- Duncan, R., Camakaris, J., Lee, B., & Luke, R. (1985). Inducible plasmid-mediated copper resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology*, *131*(4), 939-943.
- Eiland, F. (1981). The effects of application of sewage sludge on microorganisms in soil [microbial biomass, microbial activity, enzymatic activity, sewage sludge, heavy metals]. *Tidsskrift for Planteavl (Denmark)*.
- Epstein, L., & Bassein, S. (2001). Pesticide applications of copper on perennial crops in California, 1993 to 1998. *Journal of Environmental Quality*, *30*(5), 1844-1847.
- Erbe, J. L., Taylor, K. B., & Hall, L. M. (1995). Metalloregulation of the cyanobacterial *smt* locus: identification of *SmtB* binding sites and direct interaction with metals. *Nucleic Acids Research*, *23*(13), 2472-2478.
- Evangelou, V. (1998). *Environmental soil and water chemistry: principles and applications*. Wiley.
- Fajardo, A., & Martínez, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(2), 161-167.

- Fan, B., Grass, G., Rensing, C., & Rosen, B. P. (2001). *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys (X) 2Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(2), 414-418.
- Fard, R. M. N., Heuzenroeder, M. W., & Barton, M. D. (2011). Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Veterinary Microbiology*, 148(2-4), 276-282.
- Fernández, A. G., Cloeckert, A., Bertini, A., Praud, K., Doublet, B., Weill, F.-X., & Carattoli, A. (2007). Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying blaCTX-M-2 or blaCTX-M-9 from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4177-4180.
- Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325(5944), 1089-1093.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *Bulletin of the World Health Organization*, 79, 780-790.
- Fong, S. T., Camakaris, J., & Lee, B. T. (1995). Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 15(6), 1127-1137.
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107-1111.
- Foster, T. (1983). Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiological Reviews*, 47(3), 361.
- Foster, T. J. (1987). The genetics and biochemistry of mercury resistance. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 15(2), 117-140.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., & Nies, D. H. (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3804-3812.
- Friedman, M. (2015). Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3805-3822.
- Frost, L. S., Ippen-Ihler, K., & Skurray, R. A. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiological Reviews*, 58(2), 162-210.

- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722.
- Gaballa, A., & Helmann, J. D. (1998). Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5815-5821.
- Gadd, G. (1992). Microbial control of heavy metal pollution. *Microbial Control of Pollution*, pp. 69-88.
- Gadd, G. M. (1988). Accumulation of metals by microorganisms and algae. *Biotechnology: a Comprehensive Treatise*, 6, 401-433.
- Gadd, G. M., & Griffiths, A. J. (1977). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4(4), 303-317.
- Gillings, M. R. (2014). Integrons: past, present, and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 257-277.
- Gillings, M. R., Xuejun, D., Hardwick, S. A., Holley, M. P., & Stokes, H. W. (2009). Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *The ISME Journal*, 3(2), 209.
- Gort, A. S., Ferber, D. M., & Imlay, J. A. (1999). The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 32(1), 179-191.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., & Munkelt, D. (2005). FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology*, 183(1), 9-18.
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 902-908.
- Grass, G., Thakali, K., Klebba, P. E., Thieme, D., Müller, A., Wildner, G. F., & Rensing, C. (2004). Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 186(17), 5826-5833.
- Grinsted, J., & De La Cruz, F. (1990). The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid*, 24(3), 163-189.
- Guiné, V., Martins, J., Causse, B., Durand, A., Gaudet, J.-P., & Spadini, L. (2007). Effect of cultivation and experimental conditions on the surface reactivity of the metal-resistant bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 to protons, cadmium and zinc. *Chemical Geology*, 236(3-4), 266-280.

- Gullberg, E., Albrecht, L. M., Karlsson, C., Sandegren, L., & Andersson, D. I. (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio*, 5(5), e01918-01914.
- Gupta, A., Matsui, K., Lo, J.-F., & Silver, S. (1999). Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature Medicine*, 5(2), 183.
- Gupta, A., Morby, A. P., Turner, J. S., Whitton, B. A., & Robinson, N. J. (1993). Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1). *Molecular Microbiology*, 7(2), 189-195.
- Gupta, S. D., Lee, B., Camakaris, J., & Wu, H. C. (1995). Identification of cutC and cutF (nlpE) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(15), 4207-4215.
- Haney, C. J., Grass, G., Franke, S., & Rensing, C. (2005). New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 215-226.
- Hansen, L. H., Jensen, L. B., Sørensen, H. I., & Sørensen, S. J. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 145-147.
- Hantke, K. (2005). Bacterial zinc uptake and regulators. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 196-202.
- Harrison, R. M. (2001). *Pollution: causes, effects and control*: Royal Society of Chemistry.
- Hasman, H., Kempf, I., Chidaine, B., Cariolet, R., Ersbøll, A. K., Houe, H., . . . Aarestrup, F. M. (2006). Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the tcrB gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5784-5789.
- Hastings, P., Rosenberg, S. M., & Slack, A. (2004). Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 12(9), 401-404.
- Hetzer, A., Daughney, C. J., & Morgan, H. W. (2006). Cadmium ion biosorption by the thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *G. thermocatenulatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4020-4027.
- Hewitt, W. L. (1967). Penicillin-Historical Impact on Infection Control. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 145(2), 212-215.
- Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Research in Microbiology*, 152(3-4), 205-210.

- Hiraki, M. (1994). Populations of Cd-tolerant microorganisms in soils polluted with heavy metals. *Soil Science and Plant Nutrition*, 40(3), 515-524.
- Hmiel, S., Snavelly, M., Florer, J., Maguire, M., & Miller, C. (1989). Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *Journal of Bacteriology*, 171(9), 4742-4751.
- Hu, H. W., Wang, J. T., Li, J., Li, J. J., Ma, Y. B., Chen, D., & He, J. Z. (2016). Field-based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 18(11), 3896-3909.
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*, 7, 167.
- Hughes, V. M., & Datta, N. (1983). Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature*, 302(5910), 725.
- Icgen, B., & Yilmaz, F. (2014). Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Kizilirmak River isolates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(6), 735-743.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., & Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376(6542), 660.
- Iwig, J. S., Rowe, J. L., & Chivers, P. T. (2006). Nickel homeostasis in *Escherichia coli*—the *rcnR-rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function. *Molecular Microbiology*, 62(1), 252-262.
- Jansen, E., Michels, M., Van Til, M., & Doelman, P. (1994). Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, 17(3), 177-184.
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y., & Wu, M. (2012). Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. *Journal of Hazardous Materials*, 235, 178-185.
- Johnson, A. P., & Woodford, N. (2013). Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4), 499-513.
- Johnson, J. R., Sannes, M. R., Croy, C., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., . . . Belongia, E. A. (2007). Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. *Emerging Infectious Diseases*, 13(6), 838.

- Kamika, I., & Momba, M. N. (2013). Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiology*, *13*(1), 28.
- Kasprzak, K. S., & Salnikow, K. (2007). Nickel toxicity and carcinogenesis. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, *2*, 619-660.
- Kennish, M. J. (1991). *Ecology of estuaries: anthropogenic effects* (Vol. 1): CRC press.
- Knapp, C. W., Callan, A. C., Aitken, B., Shearn, R., Koenders, A., & Hinwood, A. (2017). Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(3), 2484-2494.
- Knapp, C. W., McCluskey, S. M., Singh, B. K., Campbell, C. D., Hudson, G., & Graham, D. W. (2011). Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS One*, *6*(11), e27300.
- Kobyas, M., Demirbas, E., Senturk, E., & Ince, M. (2005). Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions by activated carbon prepared from apricot stone. *Bioresour. Technol.*, *96*(13), 1518-1521.
- Koch, D., Nies, D. H., & Grass, G. (2007). The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *Biometals*, *20*(5), 759-771.
- Komárek, M., Čadková, E., Chrastný, V., Bordas, F., & Bollinger, J.-C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, *36*(1), 138-151.
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., . . . Irfan, S. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *10*(9), 597-602.
- Küpper, H., & Kroneck, P. M. (2007). Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. *Metal ions in life sciences*, Vol. 2, pp. 31-62.
- Kuroda, M., Hayashi, H., & Ohta, T. (1999). Chromosome-determined zinc-responsive operon *czr* in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiology and Immunology*, *43*(2), 115-125.
- Laddaga, R. A., Bessen, R., & Silver, S. (1985). Cadmium-resistant mutant of *Bacillus subtilis* 168 with reduced cadmium transport. *Journal of Bacteriology*, *162*(3), 1106-1110.

- Lawrence, J. G. (2000). FEATURES-Clustering of Antibiotic Resistance Genes: Beyond the Selfish Operon-This model helps in understanding transfers of gene clusters whose constituent genes contribute to a single. *ASM News-American Society for Microbiology*, 66(5), 281-286.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., . . . Wang, Z. (2009). Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environmental Microbiology*, 11(6), 1506-1517.
- Lide, D. R. (2012). CRC handbook of chemistry and physics. 12J204.
- Liebert, C. A., Wireman, J., Smith, T., & Summers, A. O. (1997). Phylogeny of mercury resistance (mer) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 1066-1076.
- Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R., & Schlegel, H. (1993). Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant cnr from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Journal of Bacteriology*, 175(3), 767-778.
- Ligon, B. L. (2004). *Penicillin: its discovery and early development*. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15(1), 52-57.
- Lin, H., Sun, W., Zhang, Z., Chapman, S. J., Freitag, T. E., Fu, J., . . . Ma, J. (2016). Effects of manure and mineral fertilization strategies on soil antibiotic resistance gene levels and microbial community in a paddy-upland rotation system. *Environmental Pollution*, 211, 332-337.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., . . . Epstein, S. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455.
- Liu, B., Li, Y., Gao, S., & Chen, X. (2017). Copper exposure to soil under single and repeated application: selection for the microbial community tolerance and effects on the dissipation of antibiotics. *Journal of Hazardous Materials*, 325, 129-135.
- Liu, C.-Q., Charoechoi, P., Khunajakr, N., Deng, Y.-M., & Dunn, N. W. (2002). Genetic and transcriptional analysis of a novel plasmid-encoded copper resistance operon from *Lactococcus lactis*. *Gene*, 297(1), 241-247.
- Liu, T., Golden, J. W., & Giedroc, D. P. (2005). A zinc (II)/lead (II)/cadmium (II)-inducible operon from the cyanobacterium *Anabaena* is regulated by AztR, an α 3N ArsR/SmtB metalloregulator. *Biochemistry*, 44(24), 8673-8683.

- Long-Fei, W., Navarro, C., & Mandrand-Berthelot, M.-A. (1991). The hydC region contains a multi-cistronic operon (nik) involved in nickel transport in *Escherichia coli*. *Gene*, *107*(1), 37-42.
- Lu, Z. H., Cobine, P., Dameron, C. T., & Solioz, M. (1999). How cells handle copper: a view from microbes. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, *12*(4), 347-360.
- Ma, X., Guo, N., Ren, S., Wang, S., & Wang, Y. (2019). Response of antibiotic resistance to the co-existence of chloramphenicol and copper during bio-electrochemical treatment of antibiotic-containing wastewater. *Environment International*, *126*, 127-133.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). Brock Biology of microorganisms 12th edn. *International Microbiology*, *11*, 65-73.
- Mahillon, J., Léonard, C., & Chandler, M. (1999). IS elements as constituents of bacterial genomes. *Research in Microbiology*, *150*(9-10), 675-687.
- Malakul, P., Srinivasan, K. R., & Wang, H. Y. (1998). Metal toxicity reduction in naphthalene biodegradation by use of metal-chelating adsorbents. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(11), 4610-4613.
- Malik, A., & Aleem, A. (2011). Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment*, *178*(1-4), 293-308.
- Manahan, S. E. (2011). *Fundamentals of environmental chemistry*: CRC press.
- Maravić, A., Šamanić, I., Šprung, M., Fredotović, Ž., Ilić, N., Dragičević, J., & Puizina, J. (2018). Broad-spectrum resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from shellfish: infrequent acquisition of novel resistance mechanisms. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(2), 81.
- Marazioti, C. (1998). Heavy Metal Tolerance and Uptake by soil bacteria. *Institute of BioScience and Technology: Cranfield University*.
- Marchant, M., Vinué, L., Torres, C., & Moreno, M. A. (2013). Change of integrons over time in *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pigs and chickens. *Veterinary Microbiology*, *163*(1-2), 124-132.
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(4), 718-733.
- Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, *22*(1), 36-41.

- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, *321*(5887), 365-367.
- Martinez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., & Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(2), 430-449.
- Máthé, I., Benedek, T., Táncsics, A., Palatinszky, M., Lányi, S., & Márialigeti, K. (2012). Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). *International Biodeterioration and Biodegradation*, *73*, 41-49.
- Mather, A., Reid, S., Maskell, D., Parkhill, J., Fookes, M., Harris, S., . . . Gilmour, M. (2013). Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. *Science*, *341*(6153), 1514-1517.
- Matyar, F. (2012). Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *89*(3), 551-556.
- McBride, M. (1994). Environmental chemistry of soils. Oxford Univ. Press, New York. *Environmental chemistry of soils. Oxford Univ. Press, New York.*, pp. 336-337.
- Medardus, J. J., Molla, B. Z., Nicol, M., Morrow, W. M., Rajala-Schultz, P. J., Kazwala, R., & Gebreyes, W. A. (2014). In-feed use of heavy metal micronutrients in US swine production systems and its role in persistence of multidrug resistant *Salmonella*. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(7), 2317-2325.
- Mellano, M. A., & Cooksey, D. A. (1988). Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of Bacteriology*, *170*(6), 2879-2883.
- Michaud, A. M., Bravin, M., Galleguillos, M., & Hinsinger, P. (2007). Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant and Soil*, *298*(1-2), 99-111.
- Mills, S., Jasalavich, C., & Cooksey, D. (1993). A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, *175*(6), 1656-1664.
- Mills, S. D., Lim, C.-K., & Cooksey, D. A. (1994). Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (cop box) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*. *Molecular and General Genetics*, *244*(4), 341-351.

- Moncrief, M. B. C., & Maguire, M. E. (1999). Magnesium transport in prokaryotes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4(5), 523-527.
- Moretti, M., de Oliveira Cardoso, L., Levy, C., Von Nowakosky, A., Bachur, L., Bratfich, O., . . . Resende, M. (2011). Controlling a vancomycin-resistant enterococci outbreak in a Brazilian teaching hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30(3), 369-374.
- Mourão, J., Novais, C., Machado, J., Peixe, L., & Antunes, P. (2015). Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5], 12: i:- clones circulating in Europe. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 610-616.
- Mulligan, C., Yong, R., & Gibbs, B. (2001). Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60(1), 193-207.
- Murray, A., & Kidby, D. (1975). Sub-cellular location of mercury in yeast grown in the presence of mercuric chloride. *Microbiology*, 86(1), 66-74.
- Muyssen, B. T., Brix, K., DeForest, D., & Janssen, C. (2004). Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 12(2), 113-131.
- Nagy, Z., & Chandler, M. (2004). Regulation of transposition in bacteria. *Research in Microbiology*, 155(5), 387-398.
- Naik, M. M., Shamim, K., & Dubey, S. K. (2012). Biological characterization of lead-resistant bacteria to explore role of bacterial metallothionein in lead resistance. *Current Science*, 426-429.
- Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R., & Roper, T. R. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2737-2744.
- Navarro, C., Wu, L. F., & Mandrand-Berthelot, M. A. (1993). The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Molecular Microbiology*, 9(6), 1181-1191.
- Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4), 209-215.
- Nieminen, T. M., Ukonmaanaho, L., Rausch, N., & Shotyk, W. (2007). Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. *Metal Ions in Life Sciences*, 2, 1-30.
- Nies, D. H. (1992). CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 174(24), 8102-8110.

- Nies, D. H. (1992). Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid*, 27(1), 17-28.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 730-750.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 313-339.
- Nies, D. H., & Silver, S. (1989). Metal ion uptake by a plasmid-free metal-sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *Journal of Bacteriology*, 171(7), 4073-4075.
- Nies, D. H., & Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 186-199.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), 382-388.
- Noguchi, N., Suwa, J., Narui, K., Sasatsu, M., Ito, T., Hiramatsu, K., & Song, J.-H. (2005). Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes qacA/B and smr of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *Journal of Medical Microbiology*, 54(6), 557-565.
- Novick, R. P., & Roth, C. (1968). Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1335-1342.
- Nriagu, J. (1978). The biogeochemistry of lead (pp. 18-88): Amsterdam: Elsevier.
- Nriagu, J. (2003). *Heavy metals and the origin of life*. Paper presented at the Journal de Physique IV (Proceedings).
- Nriagu, J. O. (1983). Occupational exposure to lead in ancient times. *Science of the Total Environment*, 31(2), 105-116.
- Oden, K. L., Gladysheva, T. B., & Rosen, B. P. (1994). Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. *Molecular Microbiology*, 12(2), 301-306.
- Odermatt, A., Krapf, R., & Solioz, M. (1994). Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ extrusion by CopB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 202(1), 44-48.
- Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R., & Solioz, M. (1992). An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. *Annals-New York Academy of Sciences*, 671, 484-484.
- Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R., & Solioz, M. (1993). Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12775-12779.

- Olafson, R., Abel, K., & Sim, R. (1979). Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89(1), 36-43.
- Oliver, M. (1997). Soil and human health: a review. *European Journal of Soil Science*, 48(4), 573-592.
- Ongeng, D., Geeraerd, A. H., Springael, D., Ryckeboer, J., Muyanja, C., & Mauriello, G. (2015). Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* in the manure-amended soil-plant ecosystem of fresh vegetable crops: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 273-294.
- Outten, C. E., Outten, F. W., & O'Halloran, T. V. (1999). DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn (II)-responsive MerR homologue in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 37517-37524.
- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A., & O'Halloran, T. V. (2001). The independent cue and cusSystems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30670-30677.
- Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J., & O'Halloran, T. V. (2000). Transcriptional Activation of an *Escherichia coli* Copper Efflux Regulon by the Chromosomal MerR Homologue, CueR. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31024-31029.
- Oyetibo, G. O., Ilori, M. O., Adebuseye, S. A., Obayori, O. S., & Amund, O. O. (2010). Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 168(1-4), 305-314.
- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. J., & Hobman, J. L. (2017). Metal resistance and its association with antibiotic resistance *Advances in Microbial Physiology*, 70, 261-313.
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. J. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16(1), 964.
- Palmiter, R. D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8428-8430.
- Panina, E. M., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 9912-9917.

- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(4), 757-784.
- Patzer, S. I., & Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *28*(6), 1199-1210.
- Patzer, S. I., & Hantke, K. (2000). The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(32), 24321-24332.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.-L., & Köhler, T. (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 8761-8768.
- Petersen, C., & Møller, L. B. (2000). Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene*, *261*(2), 289-298.
- Piddock, L. J. (2012). The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? *The Lancet Infectious Diseases*, *12*(3), 249-253.
- Pina, K., Navarro, C., Mcwalter, L., Boxer, D. H., Price, N. C., Kelly, S. M., . . . Wu, L. F. (1995). Purification and Characterization of the Periplasmic Nickel-Binding Protein NikA of *Escherichia coli* K12. *The FEBS Journal*, *227*(3), 857-865.
- Poole, K. (2017). At the nexus of antibiotics and metals: the impact of Cu and Zn on antibiotic activity and resistance. *Trends in Microbiology*, *25*(10), 820-832.
- Putman, M., van Veen, H. W., & Konings, W. N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4), 672-693.
- Que, Q., & Helmann, J. D. (2000). Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Molecular Microbiology*, *35*(6), 1454-1468.
- Rae, T., Schmidt, P., Pufahl, R., Culotta, V., & O'halloran, T. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, *284*(5415), 805-808.
- Ramchandani, M., Manges, A. R., DebRoy, C., Smith, S. P., Johnson, J. R., & Riley, L. W. (2005). Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*, *40*(2), 251-257.
- Rensing, C. (2005). Form and function in metal-dependent transcriptional regulation: dawn of the enlightenment. *Journal of Bacteriology*, *187*(12), 3909-3912.

- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., & Rosen, B. P. (2000). CopA: an *Escherichia coli* Cu (I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(2), 652-656.
- Rensing, C., Ghosh, M., & Rosen, B. P. (1999). Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *Journal of Bacteriology*, *181*(19), 5891-5897.
- Rensing, C., & Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(2-3), 197-213.
- Rensing, C., Mitra, B., & Rosen, B. P. (1997). The zntA gene of *Escherichia coli* encodes a Zn (II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(26), 14326-14331.
- Roane, T., & Pepper, I. (2000). Microorganisms and metal pollution, in environmental microbiology. *Academic Press, London*, 55.
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2009). A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends in Microbiology*, *17*(6), 251-258.
- Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand, M. S., & Eitinger, T. (2006). Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters *Journal of Bacteriology*, *188*(1), 317-327.
- Rodrigue, A., Effantin, G., & Mandrand-Berthelot, M.-A. (2005). Identification of rcnA (yohM), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(8), 2912-2916.
- Rodríguez-Montelongo, L., Volentini, S. I., Farías, R. N., Massa, E. M., & Rapisarda, V. A. (2006). The Cu (II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *451*(1), 1-7.
- Rogers, S. D., Bhawe, M. R., Mercer, J., Camakaris, J., & Lee, B. (1991). Cloning and characterization of cutE, a gene involved in copper transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *173*(21), 6742-6748.
- Rouch, D., & Brown, N. (1997). Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant pco. *Microbiology*, *143*(4), 1191-1202.
- Rowe, J. L., Starnes, G. L., & Chivers, P. T. (2005). Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(18), 6317-6323.

- Russell, M. J., & Martin, W. (2004). The rocky roots of the acetyl-CoA pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(7), 358-363.
- Sáenz, Y., Brinas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996-4001.
- Saito, M. A., Sigman, D. M., & Morel, F. M. (2003). The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: the co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean-Proterozoic boundary? *Inorganica Chimica Acta*, 356, 308-318.
- Sandegren, L., Linkevicius, M., Lytsy, B., Melhus, Å., & Andersson, D. I. (2011). Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 74-83.
- Schmidt, T., & Schlegel, H. G. (1994). Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *Journal of Bacteriology*, 176(22), 7045-7054.
- Schmitz, F.-J., Fluit, A. C., Gondolf, M., Beyrau, R., Lindenlauf, E., Verhoef, J., . . . Jones, M. E. (1999). The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(2), 253-259.
- Schouten, M., Voss, A., & Hoogkamp-Korstanje, J. (1997). VRE and meat. *The Lancet*, 349(9060), 1258.
- Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3, 399.
- Sidhu, M. S., Heir, E., Sørum, H., & Holck, A. (2001). Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β -lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *Microbial Drug Resistance*, 7(4), 363-371.
- Siguié, P., Filée, J., & Chandler, M. (2006). Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 526-531.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71-109.
- Silver, S. (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. *Gene*, 179(1), 9-19.
- Silver, S., & Ji, G. (1994). Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 3), 107-113.

- Silver, S., Nucifora, G., Chu, L., & Misra, T. K. (1989). Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(2), 76-80.
- Silver, S., & Phung, L. T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 753-789.
- Silver, S., & Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid-and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, 56(1), 195-228.
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1728.
- Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C., & Montfort, W. R. (2004). Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7815-7817.
- Singh, V. K., Xiong, A., Usgaard, T. R., Chakrabarti, S., Deora, R., Misra, T. K., & Jayaswal, R. K. (1999). ZntR is an autoregulatory protein and negatively regulates the chromosomal zinc resistance operon znt of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 33(1), 200-207.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Ready, D., Ruppe, E., Bernede-Bauduin, C., Djossou, F., . . . Andremont, A. (2010). Is exposure to mercury a driving force for the carriage of antibiotic resistance genes? *Journal of Medical Microbiology*, 59(7), 804-807.
- Slifierz, M., Friendship, R., & Weese, J. (2015). Zinc Oxide Therapy Increases Prevalence and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs: A Randomized Controlled Trial. *Zoonoses and Public Health*, 62(4), 301-308.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434-452.
- Smith, D. L., Harris, A. D., Johnson, J. A., Silbergeld, E. K., & Morris, J. G. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6434-6439.
- Smith, R. L., & Maguire, M. E. (1995). Distribution of the CorA Mg²⁺ transport system in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 177(6), 1638-1640.
- Solioz, M., & Odermatt, A. (1995). Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(16), 9217-9221.

- Solioz, M., & Vulpe, C. (1996). CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7), 237-241.
- Spain, A., & Alm, E. (2003). Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Reviews in Undergraduate Research*, 2, 1-6.
- Stahlin, B. M., Gibbons, J. G., Rokas, A., O'Halloran, T. V., & Slot, J. C. (2016). Evolution of a heavy metal homeostasis/resistance island reflects increasing copper stress in enterobacteria. *Genome Biology and Evolution*, 8(3), 811-826.
- Starzecka, A., & Bednarz, T. (1993). Comparison of development and metabolic activity of algae and bacteria in soils under the influence of short-and long-term contamination with metallurgic industrial dusts. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 71-88.
- Stepanauskas, R., Glenn, T. C., Jagoe, C. H., Tuckfield, R. C., Lindell, A. H., & McArthur, J. (2005). Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environmental Science and Technology*, 39(10), 3671-3678.
- Sterritt, R., & Lester, J. (1980). Interactions of heavy metals with bacteria. *Science of the Total Environment*, 14(1), 5-17.
- Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 790-819.
- Stokes, H. W., Holmes, A. J., Nield, B. S., Holley, M. P., Nevalainen, K. H., Mabbutt, B. C., & Gillings, M. R. (2001). Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5240-5246.
- Stoyanov, J. V., & Brown, N. L. (2003). The *Escherichia coli* Copper-responsive copA Promoter Is Activated by Gold. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1407-1410.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L., & Brown, N. L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Molecular Microbiology*, 39(2), 502-512.
- Stoyanov, J. V., Magnani, D., & Solioz, M. (2003). Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 546(2-3), 391-394.
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Microbiology*, 2(1), 25-32.

- Subramanyam, C., Venkateswerlu, G., & Rao, S. (1983). Cell wall composition of *Neurospora crassa* under conditions of copper toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, *46*(3), 585-590.
- Summers, A. O. (1986). Organization, expression, and evolution of genes for mercury resistance. *Annual Reviews in Microbiology*, *40*(1), 607-634.
- Sütterlin, S., Edquist, P., Sandegren, L., Adler, M., Tängdén, T., Drobni, M., . . . Melhus, Å. (2014). Silver resistance genes are overrepresented among *Escherichia coli* isolates with CTX-M production. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(22), 6863-6869.
- Swick, M. C., Morgan-Linnell, S. K., Carlson, K. M., & Zechiedrich, L. (2011). Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(2), 921-924.
- Tam, R., & Saier, M. (1993). Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiological Reviews*, *57*(2), 320-346.
- Tao, T., Snavelly, M. D., Farr, S. G., & Maguire, M. E. (1995). Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: *mgtA* encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg²⁺ in a manner similar to that of the *mgtB* P-type ATPase. *Journal of Bacteriology*, *177*(10), 2654-2662.
- Taylor-Robinson, D., & Bebear, C. (1997). Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *40*(5), 622-630.
- Tetaz, T. J., & Luke, R. (1983). Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *154*(3), 1263-1268.
- Thelwell, C., Robinson, N. J., & Turner-Cavet, J. S. (1998). An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(18), 10728-10733.
- Tiemersma, E. W., Bronzwaer, S. L., Lyytikäinen, O., Degener, J. E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., . . . Participants, E. A. R. S. S. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(9), 1627.
- Tsai, K., Yoon, K., & Lynn, A. (1992). ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *174*(1), 116-121.

- Tsai, K.-J., & Linet, A. L. (1993). Formation of a phosphorylated enzyme intermediate by the cadA Cd²⁺-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305(2), 267-270.
- Turner, J. S., Morby, A. P., Whitton, B. A., Gupta, A., & Robinson, N. (1993). Construction of Zn²⁺/Cd²⁺ hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4494-4498.
- Turner, J. S., Robinson, N. J., & Gupta, A. (1995). Construction of Zn²⁺/Cd²⁺-tolerant cyanobacteria with a modified metallothionein divergon: Further analysis of the function and regulation of *smt*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 14(3), 259-264.
- Tynecka, Z., Gos, Z., & Zajac, J. (1981). Reduced cadmium transport determined by a resistance plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 147(2), 305-312.
- Vakulenko, S. B., Donabedian, S. M., Voskresenskiy, A. M., Zervos, M. J., Lerner, S. A., & Chow, J. W. (2003). Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1423-1426.
- Valladares, G. S., Camargo, O. A. d., Carvalho, J. R. P. d., & Silva, A. M. C. (2009). Assessment of heavy metals in soils of a vineyard region with the use of principal component analysis. *Scientia Agricola*, 66(3), 361-367.
- Valls, M., & De Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(4), 327-338.
- van der Lelie, D., Springael, D., Römling, U., Ahmed, N., & Mergeay, M. (1999). Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 238(2), 417-425.
- Van Sprang, P., Van Gheluwe, M., Van Hyfte, A., Heijerick, D., Vandenbroele, M., & Verdonck, F. (2005). Voluntary risk assessment of copper, copper II sulphate pentahydrate, copper (I) oxide, copper (II) oxide and dicopper chloride trihydroxide. *Annex K of Draft report submitted to the European Commission, European Copper Institute*.
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., . . . Wolfs, P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173.
- Wales, A., & Davies, R. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 4(4), 567-604.

- Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., & Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(5), 355-362.
- Wang, F.-H., Qiao, M., Chen, Z., Su, J.-Q., & Zhu, Y.-G. (2015). Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *Journal of Hazardous Materials*, 299, 215-221.
- Weast, R., & Astle, M. (1984). Handbook of Chemistry and Physics, CRC, Boca Raton, FL, 1978, p. B-254.
- Wedepohl, K. H. (1995). The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(7), 1217-1232.
- Welch, R. M., & Shuman, L. (1995). Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(1), 49-82.
- Wood, J. M., & Wang, H.-K. (1983). Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science and Technology*, 17(12), 582A-590A.
- Woodford, N., Carattoli, A., Karisik, E., Underwood, A., Ellington, M. J., & Livermore, D. M. (2009). Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25: H4-ST131 clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4472-4482.
- World Health Organization, 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva: WHO Press.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175.
- Wu, L. F., & Mandrand-Berthelot, M.-A. (1986). Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie*, 68(1), 167-179.
- Wu, L. F., Mandrand-Berthelot, M. A., Waugh, R., Edmonds, C., Holt, S., & Boxer, D. (1989). Nickel deficiency gives rise to the defective hydrogenase phenotype of hydC and fnr mutants in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 3(12), 1709-1718.
- Xiong, A., & Jayaswal, R. K. (1998). Molecular Characterization of a Chromosomal Determinant Conferring Resistance to Zinc and Cobalt Ions in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180(16), 4024-4029.

- Xu, Y., Xu, J., Mao, D., & Luo, Y. (2017). Effect of the selective pressure of sub-lethal level of heavy metals on the fate and distribution of ARGs in the catchment scale. *Environmental Pollution*, 220, 900-908.
- Yazdankhah, S., Lassen, J., & Midtvedt, T. (2013). Historien om antibiotika 2502–2507.
- Ybarra, G., & Webb, R. (1998). *Differential responses of GroEl and metallothionein genes to divalent metal cations and the oxyanions of arsenic in the cyanobacterium Synechococcus sp strain PCC 7942*. Paper presented at the Proceeding of the conference on hazardous waste research.
- Ye, J., Kandegedara, A., Martin, P., & Rosen, B. P. (2005). Crystal structure of the *Staphylococcus aureus* pI258 CadC Cd (II)/Pb (II)/Zn (II)-responsive repressor. *Journal of Bacteriology*, 187(12), 4214-4221.
- Yoon, K., Misra, T., & Silver, S. (1991). Regulation of the cadA cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Journal of Bacteriology*, 173(23), 7643-7649.
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P., & Fanning, S. (2017). Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology*, 64, 23-32.
- Zhang, M., Chen, L., Ye, C., & Yu, X. (2018). Co-selection of antibiotic resistance via copper shock loading on bacteria from a drinking water bio-filter. *Environmental Pollution*, 233, 132-141.
- Zhang, W.-h., Huang, Z., He, L.-y., & Sheng, X.-f. (2012). Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead–zinc mine tailings. *Chemosphere*, 87(10), 1171-1178.
- Zhou, H., & Thiele, D. J. (2001). Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20529-20535.
- Zhou, J., & Goldsbrough, P. B. (1994). Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6(6), 875-884.
- Zhu, Y.-G., Johnson, T. A., Su, J.-Q., Qiao, M., Guo, G.-X., Stedtfeld, R. D., . . . Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201222743.
- Zouboulis, A., Loukidou, M., & Matis, K. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*, 39(8), 909-916.