

Actividad bactericida de superficies de cobre frente a bacterias asociadas a infecciones nosocomiales, en un modelo *in vitro* de adherencia y sobrevivencia

VALERIA PRADO J., MARIO ESPARZA M.^{a,*},
ROBERTO VIDAL A.^a, CLAUDIA DURÁN T.^b

Adherence to copper and stainless steel metal coupons of common nosocomial bacterial strains

Background: Copper has a bactericidal activity against a series of bacterial strains. **Aim:** To measure resistance to bacterial adherence of copper (Cu) and stainless steel (SS) metal coupons. **Material and Methods:** Bacterial strains causing nosocomial infections in Chile were analyzed. Bacterial adherence was studied using a previously described method based on a system of metal coupons that are immersed in culture media containing the bacteria of interest at room temperature. **Results:** Adherence to Cu and SS coupons was different for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* strains. For these strains, no adherence to Cu coupons occurred during the 48 h observation period compared to a rapidly increasing adherence to SS coupons, with a final colony count of $1.00E + 07$ cfu/mL. For two different *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains, inhibition of adherence was not observed on Cu coupons, and colony counts were similar for Cu and SS using the standard inoculum ($2-3 \times 10^7$ cfu). A partial decrease in adherence was observed for Cu but not for SS coupons, when a lower inoculum was used. **Conclusions:** Copper surfaces represent an interesting option to reduce bacterial contamination in the hospital environment due to its resistance to bacterial adhesion of most of the common nosocomial bacterial strains.

(Rev Med Chile 2013; 141: 291-297).

Key words: *Acinetobacter baumannii*; Bacterial antiadherent activity; Copper; Cross infection; MRSA; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*.

Las infecciones nosocomiales (IN) constituyen un problema global debido a su impacto desde el punto de vista médico, ético y de costos. Programas de control de infecciones han sido desarrollados e implementados, sin embargo, las tasas de estas infecciones no disminuyen, con el desafío de la ocurrencia de brotes de difícil manejo debido a la emergencia de bacterias hospitalarias multirresistentes. Para algunas de estas cepas las opciones terapéuticas son muy limitadas y de alto costo¹⁻⁴.

En Chile, cada año se registran 70.000 casos de

IN y se ha estimado que son responsables por un promedio de 10 días de exceso en duración de la hospitalización por paciente, lo que suma 700.000 días/cama utilizados por este concepto al año, con un exceso en los costos de USD 70.000.000 anuales⁵. También se documentó que en pacientes con IN aumentó dos a cuatro veces el uso de antimicrobianos, observándose un mayor impacto en pacientes con infección de la herida operatoria y con neumonía nosocomial⁵.

En el ambiente hospitalario, patógenos bacterianos que tienen la capacidad de producir

Programa de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^aPhD.

^bTecnólogo Médico, Magíster en Ciencias.

*Actualmente Dr. Mario Esparza M. es Jefe del Laboratorio de BioMinería, Departamento de Acuicultura, Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta.

Financiamiento: Grant InnovaChile 08CM01-19: "Desarrollo de plataforma de conocimiento y capacidades locales para la creación de nuevos productos que utilicen la propiedad antimicrobiana del cobre"

Recibido el 8 de agosto de 2012, aceptado el 19 de octubre de 2012.

Correspondencia a:
Dra. Valeria Prado
Facultad de Medicina,
Universidad de Chile
Av. Independencia 1027,
Santiago, Chile.
Celular: 9-1588576
E-mail: vprado@med.uchile.cl

biopelícula pueden colonizar diferentes superficies y sobrevivir durante largos períodos de tiempo contaminando equipos y dispositivos médicos⁶. De este modo, patógenos presentes en superficies, pueden ser traspasados a los pacientes mediante las manos del personal sanitario⁷⁻¹¹.

El cobre ha demostrado tener actividad bactericida frente a un amplio rango de patógenos incluyendo virus, bacterias y hongos. Investigadores han observado inhibición del crecimiento bacteriano de superficies de Cu frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* metálico resistente (SAMR), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida albicans*^{12,13}. Si esta propiedad de inhibir el crecimiento de patógenos nosocomiales mostrada por superficies de Cu resulta consistente y eficaz, podría ser aplicada en infraestructuras hospitalarias.

Nuestro propósito fue evaluar la capacidad de adherencia y sobrevivencia de aislamientos clínicos de patógenos nosocomiales en láminas de Cu y acero inoxidable (Ai).

Material y Métodos

Cepas bacterianas

Aislamientos clínicos de pacientes adultos fueron obtenidos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Las cepas evaluadas incluyeron: SAMR, cepa N. 1146430, multiresistente, sensible a vancomicina, aislada de un paciente con neumonía asociada a ventilación mecánica; *Klebsiella pneumoniae*, cepa N.1146431, multiresistente, productora de betalactamasa de espectro extendido, aislada de una paciente con infección del tracto urinario; *Acinetobacter baumannii*, cepa N.1143278, multiresistente, aislada de un paciente con neumonía asociada a ventilador; *Pseudomonas aeruginosa*, cepa N.1212033, multiresistente, asociada a infección urinaria y cepa N.1190556, multiresistente, aislada de secreción traqueal de un paciente con neumonía asociada a ventilador.

Ensayo de adherencia bacteriana

La adherencia bacteriana a superficies de láminas metálicas fue estudiada utilizando metodología previamente descrita por R. Vidal et al¹⁴. Brevemente, se emplearon láminas metálicas (1 cm x 1 cm x 0,1 cm) de Cu 99,9% y Ai gentilmente suministradas por Codelco Chile. Estas láminas

junto con portaobjetos de vidrio fueron lavadas con solución sulfocrómica, después con agua destilada estéril y luego esterilizadas a 180° C por 60 min. Las láminas metálicas fueron adheridas asépticamente a los portaobjetos con silicona estéril y estos fueron fijados en forma perpendicular a la cara interna de placas Petri, las cuales se utilizaron como cubiertas de jarras de vidrio conteniendo 700 mL de medio M9 estéril. Los portaobjetos con las láminas quedaron sumergidos en el medio líquido.

Cada cepa fue sembrada en agar sangre de cordero e incubada 18 h a 37°C para obtener colonias aisladas; seis colonias fueron inoculadas en 10 mL de medio M9, en duplicado e incubadas a 37°C durante 24 h en agitación constante (120 rpm). A partir de este cultivo se tomó un inóculo de 1 mL conteniendo 2-3 x 10⁷ UFC y fue agregado a la jarra con M9. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se evaluaron tres diferentes concentraciones de inóculo: 2-3 x 10⁷, 1 x 10⁶ y 4,5 x 10⁵ UFC.

Las jarras fueron incubadas a temperatura ambiente en agitación constante (80 rpm) y los portaobjetos fueron retirados a diferentes intervalos: 0-1-2-4-6-8-10-12-18-24-30-y 40 h, las láminas metálicas fueron lavadas tres veces con solución salina estéril (SSE) y luego fueron removidas de los portaobjetos. Una lámina fue teñida con naranja de acridina al 0,01% durante 5 min para visualizar y contar bacterias adheridas utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus, modelo BX60). Una segunda lámina retirada a iguales intervalos de tiempo, fue lavada tres veces con 1 mL de SSE y luego sonicada durante 5 min con 1 mL de SSE en un disruptor celular ultrasónico, Microson, modelo XL2000, Misonix Inc. Se realizó un recuento de colonias de bacterias sésiles viables sembrando la SSE post sonicación en placas de agar TSA, con la técnica de microgota descrita previamente¹². Brevemente, una alícuota de 100 ul fue diluida en forma seriada (10⁻¹ a 10⁻⁵) y 10 ul de cada dilución fue sembrada por triplicado en agar TSA y cultivada por 48 h a 37°C. Se calculó el promedio del recuento de colonias de las tres placas y fue expresado en UFC/mL. En paralelo, para cada ensayo se realizó recuento de colonias de las bacterias planctónicas, cultivando en agar TSA, diluciones seriadas del medio de cultivo donde se incubaron los portaobjetos.

Análisis estadístico

Se comparó la mediana de los recuentos de colonias (UFC/mL) obtenidas a partir de las lá-

minas de Cu y Ai usando el test de Wilcoxon. La significancia estadística se definió como $p < 0,05$. Los cálculos estadísticos realizaron usando Stata versión 10.0.

Resultados

Ensayos de adherencia con las diferentes cepas clínicas

SAMR. Se observaron diferencias significativas en la adherencia a láminas de Cu y Ai con esta cepa, la cual adhirió rápidamente al Ai, el recuento al tiempo cero fue igual al inóculo inicial y luego se observó una adherencia progresiva y creciente con un recuento final a las 48 h de $1,00E + 07$

UFC/mL. En contraste, no se detectó adherencia a Cu durante todo el período de observación en este modelo ($p = 0,0022$ para la mediana entre las curvas de Cu y Ai) (Figura 1).

Klebsiella pneumoniae. No se observó adherencia a las láminas de Cu y en Ai, la adherencia se detectó a partir de las 2 h con aumento progresivo de los recuentos que alcanzaron a $9,00E + 04$ UFC/mL a las 48 h ($p = 0,0025$) (Figura 2).

Acinetobacter baumannii. Comportamiento similar, sin adherencia a Cu y adhirió en forma muy eficiente al Ai con recuentos de $2,50E + 02$ UFC/mL a las 2 h y finales de $1,00E + 07$ a las 48 h ($p = 0,0025$) (Figura 3).

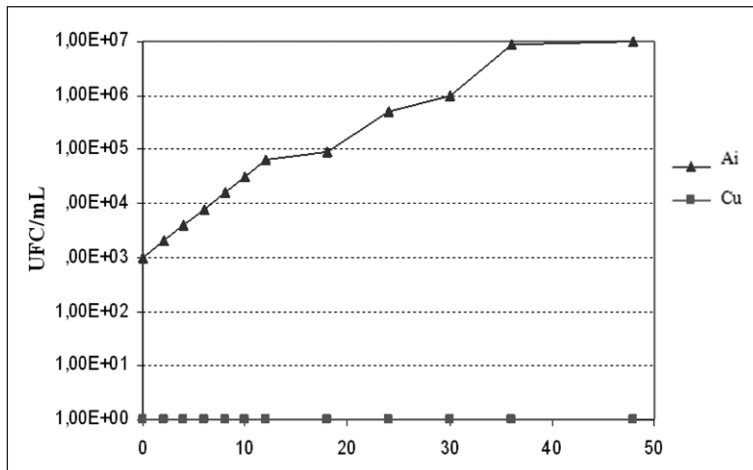


Figura 1. Adherencia de SAMR a superficies de láminas de cobre y acero inoxidable. Diferencias en el recuento de las colonias (UFC/mL) de la cepa intrahospitalaria de SAMR adheridas a la superficie de láminas de cobre (Cu ●) y láminas de acero inoxidable (Ai ■) a diferentes intervalos de incubación, utilizando un inóculo inicial de $2-3 \times 10^7$ UFC, incubando a temperatura ambiente hasta 48 h. El recuento de colonias en superficies de Cu fue cero y aparece representado en la línea horizontal a nivel de $1,00E + 00$ l. $p = 0,0022$.

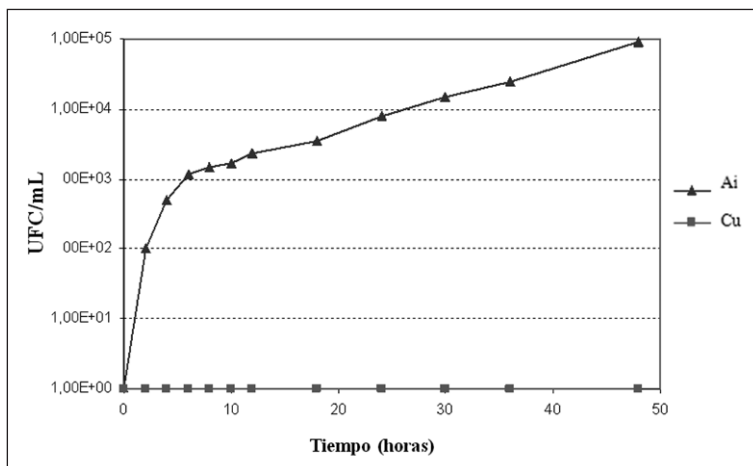


Figura 2. Adherencia de *Klebsiella pneumoniae* a superficies de láminas de cobre y acero inoxidable. Diferencias en el recuento de las colonias (UFC/mL) de la cepa de *Klebsiella pneumoniae* adheridas a láminas de cobre (Cu ●) y Ai (Ai ■) a diferentes intervalos de tiempo, con un inóculo de $2-3 \times 10^7$ UFC. El recuento de colonias en superficies de Cu fue cero para la cepa y aparece representado en la línea horizontal a nivel de $1,00E + 00$ l. $p = 0,0025$.

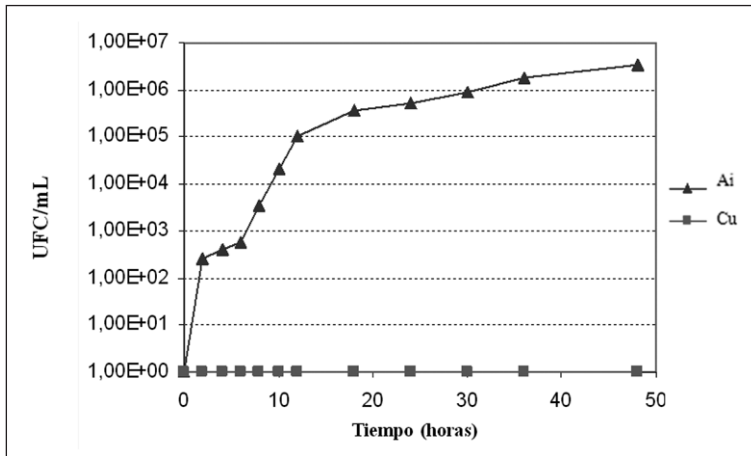


Figura 3. Adherencia de *Acinetobacter baumannii* a superficies de láminas de cobre y acero inoxidable. Muestra las diferencias registradas en los recuentos de colonias para la cepa de *Acinetobacter baumannii* en superficies de cobre (Cu ●) y Ai (Ai ■). $p = 0,0025$.

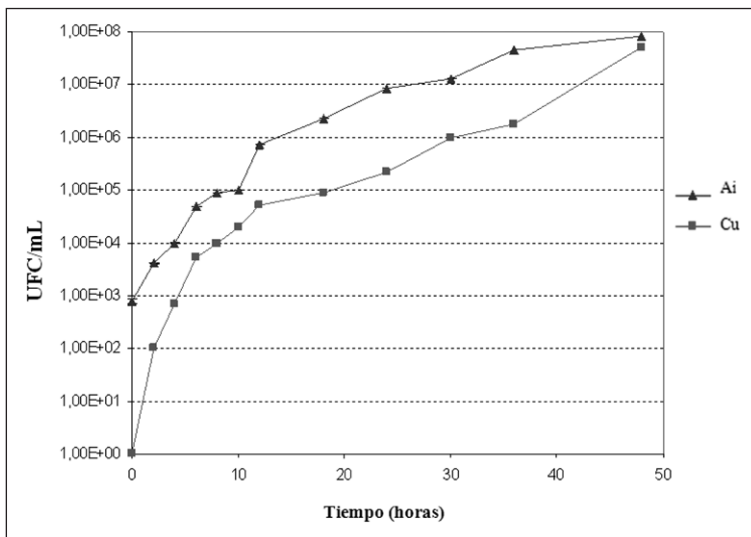


Figura 4. Adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* a superficies de láminas de cobre y acero inoxidable, con inóculo de 1×10^6 UFC. Diferencias en el recuento de las colonias (UFC/mL) de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* N° 1212033 adheridas a superficies de cobre (Cu ●) y acero (Ai ■) con un inóculo de 1×10^6 UFC, con 48 h de incubación a temperatura ambiente. $p = NS$.

Pseudomonas aeruginosa. La cepa N.1212033 adhirió en ambas superficies metálicas; en láminas de Cu se observaron discretas diferencias con respecto al Ai, con las tres concentraciones de inóculo evaluadas. En la Figura 4 se muestran los resultados con el inóculo de 1×10^6 UFC y se observa que los recuentos alcanzaron a $1,00E + 07$ UFC/mL a las 48 h en ambos tipos de láminas. Utilizando el inóculo inferior de $4,5 \times 10^5$ UFC, la adherencia en la superficie de Cu fue menor ($p = 0,0025$) (Figura 5). Resultados similares se observaron con la cepa N.1190556 (datos no mostrados).

Bacterias planctónicas

Se observaron diferencias respecto a la concentración de bacterias en el medio de cultivo en

el cual se incubaron las láminas de Cu y de Ai y los recuentos de las diferentes cepas se muestran en la Figura 6. En el caso de SAMR, ocurrió inhibición de las bacterias presentes en el medio a partir de las 18 h en las jarras con láminas de Cu, en contraste se registraron recuentos crecientes en jarras con láminas de Ai. $p = 0,018$ (Figura 6A). Para *Klebsiella pneumoniae*, en jarras con Cu el efecto inhibitorio sobre bacterias en suspensión fue precoz y sostenido, con eliminación total de bacterias en el medio a partir de las 24 h. En las jarras con Ai no se observó ningún efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano alcanzando un recuento de $7,00E + 11$ UFC/mL a las 48 h; $p = 0,0025$ (Figura 6B). En jarras donde se inoculó la cepa de *Acinetobacter baumannii*, el efecto inhibitorio sobre bacterias en suspensión

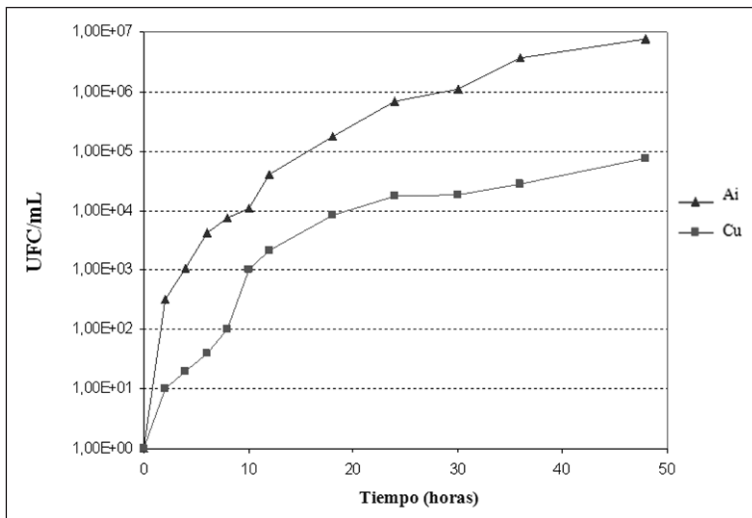


Figura 5. Adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* a superficies de láminas de cobre y acero inoxidable, con inóculo de $4,5 \times 10^5$ UFC. Diferencias en el recuento de las colonias (UFC/mL) de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* N° 212033 con un inóculo de $4,5 \times 10^5$ UFC, en láminas de cobre (Cu ●) y acero (Ai ■). $p = 0,0025$.

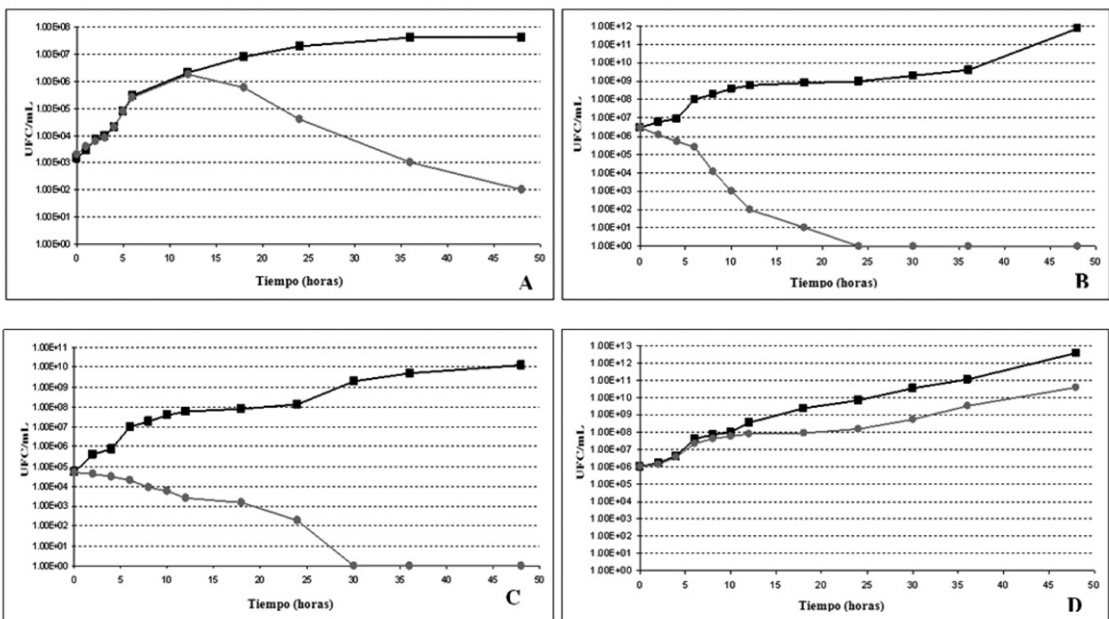


Figura 6. Efecto de láminas de cobre y acero inoxidable sobre bacterias planctónicas. Recuentos de bacterias en suspensión en jarras conteniendo láminas de cobre (→) y acero (←) sumergidas en medio de cultivo líquido M19, a temperatura ambiente y con el inóculo de $2-3 \times 10^7$ UFC. 6A. Diferencias observadas para SAMR. $p = 0,018$. 6B. Diferencias para la cepa de *Klebsiella pneumoniae*. $p = 0,0025$. 6C. Resultados registrados para la cepa de *Acinetobacter baumannii*. $p = 0,0025$. 6D. Diferencias observadas para *Pseudomonas aeruginosa* $p = 0,0025$.

se evidenció solamente a partir de las 24 h y la eliminación total ocurrió a las 30 h. Ningún efecto se evidenció en jarras con Ai; $p = 0,0025$ (Figura 6C). Las jarras en que se incubaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes inóculos no mostraron inhibición del crecimiento bacteriano

independiente de la presencia de Cu o de Ai. En la Figura 6D se muestra la curva con la cepa N.1212033 a la concentración de inóculo 1×10^6 ; a partir de la 10 h se registraron recuentos menores en jarras con Cu; $p = 0,0029$. Resultados similares se observaron con el inóculo de $4,5 \times 10^5$ (datos no mostrados).

Microscopia de epifluorescencia

Para confirmar que el bajo recuento de bacterias viables registrado en láminas de Cu correspondía efectivamente a la ausencia de células adheridas, se observaron tinciones con naranja de acridina, que detecta ácido nucleico. Las imágenes de las tinciones tuvieron total correlación con los recuentos de colonias y cuando el recuento fue negativo, no se observó fluorescencia (datos no mostrados).

Discusión

En hospitales chilenos, al igual que en otros centros donde se realizan procedimientos médicos invasivos y complejos, los patógenos asociados con mayor frecuencia a infecciones nosocomiales son SAMR, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Todas estas bacterias tienen en común la capacidad para producir biopelícula, lo cual les permite colonizar y sobrevivir por largos períodos de tiempo adheridas a diferentes superficies¹⁻⁷.

La percepción general es que el acero inoxidable es el material óptimo para la infraestructura sanitaria debido a su resiliencia, facilidad de limpieza y resistencia a la corrosión. Los resultados de este estudio *in vitro* muestran con mucha fuerza que, cepas clínicas de patógenos con frecuencia asociados a infecciones nosocomiales, se adhieren con gran facilidad a superficies de Ai y pueden multiplicarse en ellas en un ambiente con concentraciones mínimas de nutrientes. En contraste, superficies de Cu metálico son resistentes a la adherencia de la mayoría de patógenos hospitalarios. Estos resultados están en la misma línea de otros estudios que muestran la actividad bactericida del Cu y sus aleaciones, midiendo curvas de muerte de diferentes patógenos después de exposición a láminas de Cu metálico^{12,15,16}.

El mecanismo íntimo que explica la actividad antibacteriana del Cu no está totalmente dilucidado. Algunos estudios sugieren que el Cu a concentraciones elevadas tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la producción de radicales de hidróperóxido, los cuales potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo bacteriano, interfiriendo con la síntesis proteica, actividad de enzimas esenciales y la función de la membrana celular^{17,18}.

El presente estudio aporta información adi-

cional sobre la actividad bactericida del Cu ya que muestra como a temperatura ambiente, un elevado inóculo bacteriano ($2-3 \times 10^7$ UFC) de los patógenos nosocomiales más frecuentes, no logra adherir a superficies de Cu metálico. Esto se registró claramente para SAMR, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*. En contraste, estas cepas clínicas adhirieron fácilmente a superficies de Ai, en las cuales se multiplicaron a temperatura ambiente. Si extrapolamos esta situación al ambiente de Unidades de Cuidados Intensivos donde muchas superficies como barandas de camas, manillas, botones de llamada, mesas de apoyo, son manipulados con frecuencia por personal sanitario, pacientes y visitas, es fácil vislumbrar que estas superficies se contaminan con residuos de secreciones biológicas y bacterias patógenas. Superficies que permiten el crecimiento bacteriano pueden transformarse en reservorios, por lo cual recomendamos el uso de superficies de Cu dentro de los hospitales, en puntos críticos de alta manipulación, como un complemento que contribuya a disminuir la transmisión de patógenos y proteger especialmente a los pacientes más vulnerables.

Un hallazgo interesante fue observar el efecto inhibitorio Cu sobre las bacterias planctónicas presentes en el medio de cultivo de la jarra donde estaban sumergidas las láminas de Cu, sugiriendo que cationes de Cu, pueden liberarse a partir de estas láminas.

Las láminas de Cu mostraron un efecto menos eficiente frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes chilenos, lo cual difiere de lo observado en otras latitudes. Mehtar et al en un estudio realizado en Sudáfrica muestra inhibición total del crecimiento de láminas de Cu frente a patógenos intrahospitalarios incluidas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*¹². Se han descrito mecanismos de tolerancia al Cu en diferentes especies bacterianas^{19,20}. El comportamiento de estas cepas chilenas podría explicarse por la eventual producción de proteínas fijadoras de Cu por parte de estas cepas, las cuales podían formar un complejo y detoxificar el Cu; este tipo de proteínas ha sido descrito en cepas de *Vibrio* y *Pseudomonas spp.*^{17,21}. También han sido descritos en *Pseudomonas* y *E. coli*, genes de resistencia al Cu codificados en plasmidios²².

Nuestro estudio confirma observaciones previas demostrando la capacidad bactericida de superficies de cobre frente a los patógenos nosocomiales más frecuentes, al mismo tiempo que

sugiere que su actividad no es homogénea para las diversas especies y pueden existir diferencias geográficas. El cobre metálico representa una alternativa interesante para recubrir superficies de alto contacto dentro de hospitales como un complemento a otras medidas de control de infecciones.

Agradecimientos: Nuestros agradecimientos al Sr. Dante Cáceres por el análisis estadístico y al Dr. Francisco Silva por suministrar las cepas clínicas.

Referencias

1. Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982; 97: 309-17.
2. Jernigan JA, Titus MG, Groschel DH, Getchell-White S, Farr BM. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 496-504.
3. Wilks M, Wilson A, Warwick S, Price E, Kennedy D, Ely A, et al. Control of an Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* calcoaceticus Colonization and Infection in an Intensive Care Unit (ICU) Without Closing the ICU or Placing Patients in Isolation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 654-8.
4. Fillaux J, Dubouix A, Conil JM, Laguerre J, Marty N. Retrospective Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated During a 4-Year Period in a University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 647-53.
5. Brenner P, Nercelles P, Pohlenza M, Otaíza F. Costo de las infecciones intrahospitalarias en hospitales chilenos de alta y mediana complejidad. *Rev Chil Infect* 2003; 20: 285-90.
6. Embil JM, McLeod JA, Al-Barrak AM, Thompson GM, Aoki FY, Witwicki EJ, et al. An outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on a burn unit: potential role of contaminated hydrotherapy equipment. *Burns* 2001; 27: 681-8.
7. Duckro AN, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Arch Intern Med* 2005; 165: 302-7.
8. da Silva Coimbra MV, Silva-Carvalho MC, Wisplinghoff H, Hall CO, Tallent S, Wallace S, et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. *J Hosp Infect* 2003; 53: 103-10.
9. Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Germanson TP, Gold HS, Durbin LJ, et al. A hospital epidemic of vancomycin-resistant *Enterococcus*: risk factors and control. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 140-7.
10. Bhalla A, Pultz NJ, Gries DM, Ray AJ, Eckstein EC, Aron DC, et al. Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 164-7.
11. Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 577-81. Copper Antimicrobial Research Program Page 22 of 22.
12. Mehtar S, Wiid I, Todorov SD. The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an *in vitro* study *J Hosp Infect* 2008; 68: 45-51.
13. Noyce JO, Michels H, and Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect* 2006; 63: 289-97.
14. Vidal R, Domínguez M, Urrutia H, Bello H, González G, García A, et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios* 1996; 86: 49-58.
15. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* O157 cross-contamination during food processing. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4239-44.
16. Faúndez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* 2004; 4: 19-23.
17. Gordon AS, Howell LD, Harwood V. Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Can J Microbiol* 1994; 40: 408-11.
18. Rodríguez-Montelongo L, De La Cruz-Rodríguez L, Fariñas RN, Mass EM. Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1144: 77-84.
19. Rosen B. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; A133: 689-3.
20. Boal A, Rosenzweig A. Structural biology of copper trafficking. *Chem Rev* 2009; 109: 4760-79.
21. Espirito Santo C, Taude N, Nies D, Grass G. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 977-86.
22. Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 51: 730-50.