



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**PREVALENCIA Y TRASMISIBILIDAD DE DETERMINANTES DE
RESISTENCIA A METALES PESADOS EN *Escherichia coli*
AISLADAS DE PACIENTES CON INFECCIONES EN EL TRACTO
URINARIO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la bachiller Emily María Bazdikian
Torres como requisito parcial para
optar al título de Licenciado en
Biología

Tutor(a): Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA
MARZO - 2013

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicárselo a mi familia, que siempre estuvieron apoyándome, siempre estuvieron acompañándome en todo lo que necesité durante la realización de este proyecto y durante toda la carrera, sin ellos no lo podría haberlo logrado

Se lo dedico a mi mamá y a mi papá, dos de las personas más importantes en mi vida. Siempre pusieron su Fe en mí, me acompañaron durante todo este largo trayecto, que mirando atrás parece haber pasado demasiado rápido. Se lo dedico a ellos por siempre alentarme a ser una buena muchacha, por decirme que lo más importante en la vida es lo que está en la mente, y que por esa razón tenía que seguir con mis estudios.

A mis hermanos Gregory, Sarkis y Melany, que me ayudaron a distraerme cuando pensaba que ya no podía más, por irme a buscar y llevar al laboratorio infinidad de veces, por todo. Los amo. A ustedes les deseo lo mejor siempre.

A todo el resto de mi familia, que si los nombro uno a uno, no terminaría. Quiero que sepan que fueron piezas claves de este éxito alcanzado, los logros de ustedes me alentaron siempre a ser mejor, gracias por ser mi ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quisiera agradecerle a la ilustre Universidad Central de Venezuela, a la casa que vence las sombras, por abrirme las puertas para realizar mis estudios de pregrado en mi querida Facultad de Ciencias.

Agradezco a mi tutora, la profesora Guillermina Alonso, por ser siempre la persona más sabia que he conocido, por su apoyo, sus enseñanzas, por su preocupación, por su sinceridad, por siempre saber la mejor manera de hacer y decir las cosas, por ser simplemente la mejor tutora. Usted es un ejemplo a seguir, y creo que como todos los que vimos Genética General con usted, jamás olvidaré que el ADN es la molécula perfecta. Gracias por todo, la quiero muchísimo.

Agradezco a los profesores que me acompañaron a lo largo de mi carrera, gracias por aportarme todos sus conocimientos en sus respectivas áreas, gracias por ayudar en mi formación como Licenciada.

Agradezco a mis papás por siempre dejarme la libertad de elegir lo que quería estudiar, y lo que quería hacer en mi vida. Gracias por todo el apoyo, por aguantarme, por los regaños, por las enseñanzas, por las risas, por las lágrimas, por entenderme, por todo lo que me han dado en esta maravillosa vida, los amo profundamente.

Agradezco a mis tres bellos hermanos: Gregory, Sarkis y Melany, que aunque yo sé que a veces soy la fastidiosa de la casa, ellos me aguantan en cada uno de mis dramas. Greg gracias por llevarme, esperarme, acompañarme cuando tenía que ir los fines de semana al Instituto, por ser tan bueno en química y haberme ayudado tanto en mis primeros semestres, por todo el cariño que siempre me has dado hermano. Sarkis y Melany, gracias por ser la distracción más divertida en mis momentos de estrés. Ustedes son los mejores hermanos que alguien jamás pudiera pedir, y aunque no se los diga siempre, quiero que sepan que los amo muchísimo.

Gracias a mis dos mejores amigas, casi hermanas, en la carrera: Maye y Xol, ustedes son las mejores amigas que pude haberme encontrado jamás, las adoro infinitamente. Gracias morochita por todo el cariño, apoyo y la ayuda que me has dado tú y tu familia, quienes se convirtieron mi segunda familia. El amor y apoyo infinito que siempre me brindaron jamás lo olvidaré y nunca podré agradecerles suficiente, lo adoro muchísimo. Xol gracias por leerte todos los libros que yo me leía para comentarlos, por escuchar la música que te recomendaba, por ser tan brillante siempre en todo. Las amo. Agradezco a Nany, Alejandra, Erick, Juan Vicente, Juan Carlos, Clelia, Luisana, Jhoniel, Vicky, Lila, Daniel, Nathalie,

Enrique, José, Andreina, Angela, Daznia, Waleska, que de una u otra manera estuvieron presentes siempre.

A mis queridos compañeros del sótano, siempre ayudándome y aconsejándome para cumplir exitosamente con mi tesis. Gracias Yusibeska, María Alexandra, Indira, profesora Aura, a la profesora Juana del CVCM, y especialmente gracias a Giovanni que me ayudó y enseñó todo lo que debía hacer en el trabajo en el laboratorio, gracias por ser mi mentor y mi amigo. Agradezco a Dani y a Ruth, que siempre han estado ahí, se convirtieron en unas grandes amigas y en un gran apoyo los últimos años, me encantó que formaran parte de mi vida universitaria, las quiero muchísimo. Agradezco a los miembros del LMV, por prestarme la balanza cada vez que la necesitaba y por permitirme compartir con ustedes en muchas de sus celebraciones, gracias profesora Maira, Beatriz, Eder, Sandra, Erick.

Agradezco a mis amigas del colegio María y Johanna, ellas fueron el mejor escape de mi rutina universitaria, gracias por apoyarme y por el cariño que me brindaron siempre, a pesar de que pasara meses perdida, y sin verlas por estar full con la carrera. Son las mejores, las amo.

Y por último, pero no menos importante, quiero agradecerle a Dios, que siempre me ha guiado por el buen camino, y al que infinidad de veces acudí para buscar esperanza, y porque me hizo entender que las cosas siempre pasan por una razón. Gracias a todos.

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Bacterias y su metabolismo.....	1
1.2 Infecciones en humanos y las enterobacterias.	2
1.2.1 Infecciones en el tracto urinario ITU y las bacterias anaeróbicas.....	4
1.3. Biorremediación.....	5
1.4. Intercambio de información genética en bacterias.....	7
1.4.1. Transformación.....	8
1.4.2. Transducción.....	8
1.4.3. Conjugación.	9
1.5. METALES PESADOS.....	11
1.5.1. Bario.	13
1.5.2. Cobalto.....	14
1.5.3. Cobre.....	16
1.5.4. Estroncio.....	17
1.5.5. Molibdeno.....	18
2. ANTECEDENTES.....	20
2.1. Estudios a nivel internacional.....	20

2.2. Estudios a nivel nacional.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. OBJETIVOS.....	29
5. PLAN DE TRABAJO.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
-Cultivo de las bacterias aisladas de pacientes con infecciones urinarias.....	31
-Preparación de los medios de cultivo suplementados con diversas concentraciones de sales de metales pesados.....	32
-Evaluación fenotípica de los aislados de <i>E. coli</i> utilizadas.....	32
-Conjugación bacteriana.....	34
-Frecuencia de transferencia en la conjugación.....	36
-Pruebas de cotransferencia de diversos marcadores.....	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1. Determinación de la resistencia hacia distintos antimicrobianos.....	37
7.2. Determinación de la resistencia de las distintas sales de metales pesados...	39
7.2.1. Bario.....	39
7.2.2. Cobalto.....	42
7.2.3. Cobre.....	43
7.2.4. Estroncio.....	46
7.2.5. Molibdeno.....	48
7.2.6. Resultados globales de los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia a diversas sales de metales pesados.....	50
7.3. Resultados de las conjugaciones. Determinación de la frecuencia de transferencia de genes de resistencia.....	54

7.3.1. Cloruro de cobalto.....	54
7.3.2. Sulfato de Cobre.....	56
7.4. Pruebas de cotransferencia.....	57
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	72
10. RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74

INDICE DE FIGURAS

1. Bacteria Gram negativa: <i>Escherichia coli</i>	3
2. Esquema de procesos de transferencia de material genético.....	8
3. Conjugación bacteriana.....	10
4. Contaminación de aguas por metales pesados generados por industrias...11	
5. Stock de las sales de metales pesados utilizados para los experimentos....	33
6. Ejemplos de placas con medio LB suplementadas con sales de metales pesados.....	33
7. Patrón de las siembras en las placas de Petri, de las distintas diluciones y determinación de los títulos.....	35
8. Patrón de las siembras en las placas de Petri, de las distintas diluciones de las mezclas de conjugación.....	35
9. Resultados obtenidos en los ensayos de fenotipo de los 50 aislados y la cepa control, a diversas concentraciones de cloruro de bario.....	41
10. Porcentaje de aislados resistentes a las concentraciones de CoCl_2 ensayadas.....	43
11. Porcentajes de aislados que presentaron resistencia a las distintas concentraciones de CuSO_4 ensayadas.....	45
12. Porcentajes de aislados resistentes a las concentraciones de cloruro de estroncio ensayadas.....	48
13. Porcentaje de aislados resistentes a las diversas concentraciones de molibdato de sodio.....	50
14. Resultados de las pruebas fenotípicas realizadas para los 50 aislados, de la concentración más alta ensayada para cada sal.....	52

INDICE DE TABLAS

I. Tabla que muestra los resultados de ensayos fenotípicos de resistencia a metales pesados en medio sólido LB.....	26
II. Porcentajes de resistencia de los 50 aislados de pacientes ambulatorios con ITU.....	32
III. Verificación del perfil de resistencia a Ampicilina y a Rifampicina de los aislados bacterianos analizados.....	38
IV. Resultados obtenidos en los ensayos a los 50 aislados, con distintas concentraciones de cloruro de bario.....	40
V. Resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos de los 50 aislados y la cepa control, a diversas concentraciones de cloruro de cobalto.....	42
VI. Resultados obtenidos al realizar ensayos a los 50 aislados con concentraciones variadas de sulfato de cobre.....	44
VII. Resultados de los ensayos fenotípicos de diversas concentraciones de cloruro de estroncio.....	46
VIII. Resultados de las pruebas de fenotipo realizadas a los aislados utilizando molibdato de sodio.....	48
IX. Resumen de los resultados de las pruebas fenotípicas de los 50 aislados....	51
X. Fenotipo de resistencia de los 50 aislados a cloruro de cobalto 2 mM y sulfato de cobre 5 mM.....	53
XI. Resultados de las conjugaciones realizadas con el marcador de cloruro de cobalto 2 mM.....	55
XII. Resultados de las conjugaciones realizadas con el marcador de cloruro de cobalto 2 mM.....	56
XIII. Resultados obtenidos de las pruebas de cotransferencia de genes de resistencia a diversas sales de metales pesados.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

Centro Médico Docente La Trinidad CMDLT	Estaño Sb
Concentración Mínima Inhibitoria CMI	Estroncio Sr
Infrecciones en el Tracto Urinario ITU	Hidrógeno H
Libras lb	Hierro Fe
Microlitros μ L	Mercurio Hg
Microgramo μ g	Molibdeno Mo
Mililitros mL	Níquel Ni
Milimolar mM	Oxígeno O
Partes por millón ppm	Plata Ag
Rifampicina RIF	Plomo Pb
Unidades Klett UK	Selenio Se
Elementos:	Talio Tl
Arsénico As	Vanadio V
Bario Ba	Zinc Zn
Berilio Be	Sales:
Bismuto Bi	Cloruro de Bario BaCl_2
Cadmio Cd	Sulfato de Cobre CuSO_4
Cobalto Co	Cloruro de Cobalto CoCl_2
Cromo Cr	Cloruro de Estroncio SrCl_2
Cobre Cu	Molibdato de Sodio Na_2MoO_4

RESUMEN

Escherichia coli es la enterobacteria más conocida, encontradas de forma natural en el tracto gastrointestinal. Existen diversas cepas de esta especie que pueden ser agentes infecciosos en los humanos. Las infecciones del tracto urinario (ITU) son las más comunes de todas las infecciones bacterianas. Éstas son diagnosticadas de acuerdo a una gran variedad de cuadros clínicos cuya manifestación dependerá de los mecanismos de defensa de la persona infectada y de la cantidad de bacterias que causan la infección.

Los microorganismos también juegan un papel clave en la biósfera, particularmente en las áreas de las biotransformaciones de metales y minerales y los ciclos biogeoquímicos, las cuales pueden tener consecuencias beneficiosas o perjudiciales para los seres vivos. Algunos metales pesados son nutrientes traza esenciales para los microorganismos, pero en altas concentraciones resultan tóxicos. Los microorganismos poseen mecanismos que le han conferido resistencia hacia los efectos de los metales tóxicos, a los que los humanos se encuentran expuestos constantemente. Algunos sistemas microbianos de tolerancia y resistencia a metales tienen el potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos, como la biorremediación de la contaminación ambiental por metales tóxicos, o la recuperación de metales valiosos.

Las bacterias poseen un genotipo que transmiten por herencia y un fenotipo que depende de las circunstancias que las rodean. Pero además se puede producir ganancia de material genético mediante diversos procesos entre los que se encuentra la conjugación, en el que ocurre la transferencia de material genético de una célula donadora a otra receptora mediante el contacto físico.

En nuestro país hay una elevada frecuencia de las ITU causadas por *E. coli*, que son resistentes a múltiples antimicrobianos, sin embargo, se conoce poco sobre la resistencia de estos aislados a los metales pesados.

Mediante técnicas microbiológicas se realizaron ensayos para determinar el fenotipo de resistencia a sales de Bario, Cobalto, Cobre, Estroncio y Molibdeno de 50 aislados identificados como *E. coli*, de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU), y la capacidad que éstos tienen de transferir dichos genes de resistencia mediante la conjugación. El 24% (12 aislados) de los aislados fue resistente a Co 2mM, el 46% (23 aislados) fue resistente a Cu 5mM, mientras que para Ba, Sr y Mo no se pudo determinar los CMI. En los ensayos del proceso de conjugación se encontró que todos los aislados con resistencia a Co 2mM y Cu 5mM fueron capaces de transferir dichos genes de resistencia. Estos resultados sugieren que los genes de resistencia se encuentran codificados en plásmidos, y que mediante procesos de transferencia de material genético horizontal éstos pueden propagarse a otras células.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias y su metabolismo.

En el ambiente habitan diversos microorganismos a los cuales los seres humanos se encuentran expuestos. Estos microorganismos cumplen funciones que pueden ser beneficiosas o perjudiciales. A diferencia de los macroorganismos, los microorganismos son capaces de realizar sus procesos vitales de crecimiento, producción de energía y reproducción, de forma independiente de otras células (*Brock y col., 2002*).

Las bacterias pueden ser clasificadas de acuerdo a las características que éstas poseen, tomando en cuenta su forma (cocos, bacilos, espirilos), su capacidad de síntesis de sustratos (auxótrofas o heterótrofas), la composición de la pared celular, según su respiración (aerobia, anaerobia o facultativa), entre otras (Tomado de: <http://www.duiops.net/seresvivos/bacterias.html>).

La fuente de energía (compuestos químicos o luz) y la manera en la cual el microorganismo la utiliza es muy variada, pero independientemente del sustrato o el mecanismo que emplee, el objetivo final es la obtención de ATP, el cual es mediador de muchas reacciones bioquímicas en los procesos metabólicos. Las fuentes energéticas pueden ser orgánicas o inorgánicas. Las orgánicas incluyen un gran número de compuestos que van desde moléculas de 2 átomos de carbono hasta moléculas más complejas tales como el almidón, el cual contiene una gran cantidad de átomos de carbono. Las fuentes inorgánicas incluyen el dióxido de

carbono, sulfuro de hidrógeno y otras moléculas (*Bastardo y Pedique, 2001*). Algunos metales pesados son también nutrientes traza, esenciales para las bacterias, pero que en concentraciones micro o milimolares resultan tóxicos. Los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales pesados, tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de estos elementos (*Marrero-Coto y col., 2010*).

1.2 Infecciones en humanos y las enterobacterias.

Una infección se define como la implantación y el desarrollo de patógenos o parásitos en un organismo (hospedador) (*Tomado de: http://danival.org/600%20microbio/6200microclin/microclin_100_infeccion.html*).

Los organismos parásitos dependen de sus hospederos, estableciéndose entre ellos una relación simbiótica del tipo dinámica. La naturaleza de una infección puede variar ampliamente en relación con la gravedad, la localización y el número de microorganismos que participan en el proceso. Una enfermedad causada por un agente infeccioso es cualquier desviación de la salud, por la que parte o la totalidad del hospedero no está equilibrado y es incapaz de realizar sus funciones normales, debido a la presencia del organismo parasitario o sus productos (*Brock y Madigan, 2002*).

Las enterobacterias comprenden un grupo relativamente homogéneo de bacterias que se caracterizan por ser anaerobias facultativas, Gram negativas, no esporuladas, no móviles, (en caso de ser móviles es debido a la presencia de flagelos de inserción peritrica), con requerimientos nutricionales relativamente

simples, y capaces de fermentar azúcares con diversos productos finales. Algunos de los microorganismos pertenecientes a esta familia son patógenos para el ser humano. *Escherichia coli* es la enterobacteria que más se ha estudiado y por lo tanto, de la cual más se conoce. Existen diversas cepas de esta especie, que son agentes infecciosos en los humanos. Debido a la importancia médica de las enterobacterias, se han aislado y estudiado un gran número de ellas. Dado que estos organismos pueden ser cultivados a partir de aislamientos clínicos, se requieren algunos métodos de identificación que faciliten el tratamiento de la infección rápidamente (Brock, 2002).

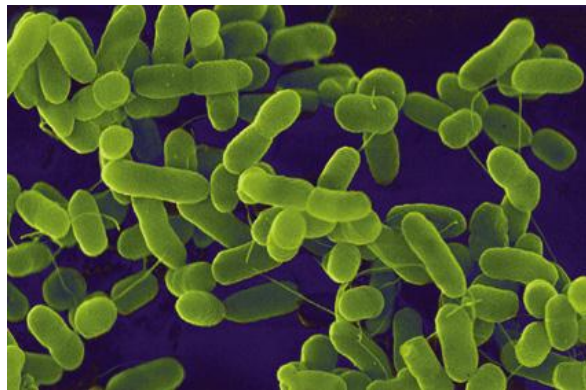


Figura 1.- Bacteria Gram negativa: *Escherichia coli* (Tomado de: <http://www.packagingnews.co.uk/news/e-coli-cannot-survive-in-corrugated-packaging-say-eu-manufacturers/>)

Los bacilos Gram negativos de la familia *Enterobacteriaceae*, como el nombre de la misma indica, son frecuentemente encontrados de forma natural en el tracto gastrointestinal. Previo a la existencia de los antibióticos y los inmunosupresores, los miembros de esta familia estaban limitados esencialmente a causar enfermedades del tracto gastrointestinal y urinario. Actualmente, las enterobacterias pueden ser aisladas en el laboratorio a partir de diferentes

muestras clínicas provenientes de diferentes lugares de infección (*Koneman y col., 1983*).

1.2.1 Infecciones en el tracto urinario ITU y las bacterias anaeróbicas.

Las Infecciones en el tracto urinario son las más comunes de todas las infecciones bacterianas. Las ITU son diagnosticadas de acuerdo a una gran variedad de cuadros clínicos, cuya manifestación dependerá de la cantidad de bacterias que causan la infección y de los mecanismos de defensa de la persona infectada. Gran parte de las bacterias causantes de éstas infecciones provienen del intestino grueso y entran a la vejiga luego de haberse instalado inicialmente en la uretra, colonizan tanto la zona uretral como la periuretral (*Colombini, 2011*). Algunas especies bacterianas responsables de las ITU son: Estreptococos, *Pseudomonas aeruginosa*, y enterobacterias (*Koneman y col., 1983*).

Muchos son los microorganismos causantes de infecciones o enfermedades en humanos, sin embargo las bacterias más frecuentemente aisladas a partir de muestras clínicas, son las anaerobias. Las bacterias anaerobias son un grupo conformado por organismos que no requieren oxígeno molecular para llevar a cabo sus actividades metabólicas; la presencia de este elemento provoca efectos tóxicos que impiden su crecimiento, pues al carecer de las enzimas necesarias para la degradación de radicales libres, los productos de las diferentes reacciones del oxígeno con la materia orgánica provocan la muerte de las células (*Quesada-Gómez, 2010*).

En los últimos años, la atención e importancia que se ha brindado a las bacterias anaerobias ha aumentado por diversas razones, entre las que destacan: su prevalencia como flora normal del ser humano, su reconocimiento como agentes etiológicos en una amplia variedad de infecciones, los procedimientos especiales que se requieren para su aislamiento e identificación, la dificultad del manejo terapéutico de las infecciones que provocan y el aumento en la resistencia de este grupo de bacterias contra muchos de los agentes antimicrobianos que se utilizan en su tratamiento (*Quesada- Gómez, 2010*).

Uno de los aspectos más importantes de este grupo bacteriano radica en su predominio como flora bacteriana normal del ser humano, llegando a superar ampliamente a los aerobios en algunas áreas del cuerpo. Sus reservorios principales son: la cavidad oral, el tracto respiratorio superior, la piel, el tubo digestivo y el tracto genital. (*Quesada-Gómez, 2010*).

En muchos casos las infecciones causadas por bacterias anaeróbicas son serias y presentan alto grado de mortalidad. En su mayoría, los anaerobios se comportan como patógenos oportunistas, causando infecciones al romper el equilibrio homeostático entre el hospedero y los microorganismos (*Quesada-Gómez, 2010*).

1.3. Biorremediación

Los microorganismos juegan un papel clave en la biosfera, particularmente en las áreas de las biotransformaciones y los ciclos biogeoquímicos, las transformaciones de metales y minerales, las cuales pueden tener consecuencias

beneficiosas o perjudiciales en el contexto humano y otras formas de vida; la descomposición, y la formación del suelo. Los microorganismos tienen una variedad de propiedades que pueden causar efectos en la especiación de los metales, toxicidad y movilidad (*Gadd, 2010*).

Las bacterias poseen mecanismos que le han conferido resistencia hacia los efectos de los metales tóxicos, a los que los humanos se encuentran expuestos constantemente, y que en la naturaleza son comúnmente encontrados en sus formas ionizadas. El estudio de las interacciones de los microorganismos y los metales puede ser útil para el entendimiento de las relaciones de los metales tóxicos con organismos superiores como mamíferos y plantas. Algunos sistemas microbianos de tolerancia y resistencia a metales tienen además el potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos, como la biorremediación de la contaminación ambiental por metales tóxicos, o la recuperación de metales valiosos (*Cervantes y col., 2006*).

La biorremediación puede definirse como un proceso por el cual se utilizan los microorganismos o sus enzimas para retornar al ambiente los contaminantes en sus forma no tóxica (*Alonso y col., 2008*). El término biorremediación fue acuñado a principios de 1980. Los microorganismos pueden degradar los desechos en productos menos tóxicos, concentrar e inmovilizar sustancias tóxicas tales como metales pesados; minimizar desechos industriales y rehabilitar áreas afectadas con diversos contaminantes. De este modo la biorremediación permite mejorar los ecosistemas dañados, acelerando algunos procesos naturales (*Whiteley y Lee, 2005*).

Considerando el gran número de químicos contaminantes y su presencia en miles de sitios, el desarrollo de la tecnología de remediación de aguas subterráneas y de áreas contaminadas es un gran reto. La biorremediación es frecuentemente considerada como una tecnología costeable y efectiva, mediante la cual se utilizan microorganismos para la mineralización o detoxificación de contaminantes (*Timmis y Pieper, 1999*).

1.4. Intercambio de información genética en bacterias.

Las bacterias poseen un genotipo que transmiten por herencia y un fenotipo que depende de las circunstancias que les rodean. Las bacterias pueden sufrir variaciones en sus caracteres y son de dos tipos: fenotípicas y genotípicas. El estudio de la genética bacteriana permite un mejor entendimiento de las funciones esenciales de su material genético y las características que rigen su comportamiento, la capacidad de adaptación al medio ambiente, la expresión de los mecanismos de virulencia que les permite colonizar, invadir, y dañar células eucariotas, y como consecuencia, el desarrollo de enfermedades (*López, 2011*).

El crecimiento en los diferentes tipos de medio de cultivo permite detectar, en la mayoría de los casos, el genotipo bacteriano, el cual puede ser modificado por ganancia de material genético y la posterior recombinación. La ganancia de material genético en bacterias puede darse por tres procesos. Estos procesos son: transformación, transducción y conjugación (*Brock, 2002*).

1.4.1. Transformación

La transformación bacteriana es un proceso por el cual el DNA libre se incorpora en el cromosoma de una célula receptora, trayendo como consecuencia un cambio genético (Brock, 2002). En otras palabras, la transformación consiste en la conversión de un genotipo en otro por la introducción de DNA desnudo. Este DNA desnudo se incorpora al cromosoma bacteriano mediante un proceso de ruptura e inserción, sin la necesidad de que ocurra contacto entre dos células (Griffiths y col., 2002).

1.4.2. Transducción

La transducción se puede definir como el proceso de transferencia genética, desde una célula donante a otra receptora, mediante partículas de bacteriófagos que contienen DNA genómico de la célula donante. Inicialmente el material genético se introduce en el interior de la cápside del fago. Luego esta partícula transductora inyecta de forma habitual el DNA que porta, a la célula receptora, donde este DNA puede eventualmente recombinarse con el cromosoma y expresar su información (Alché y García, 2010).

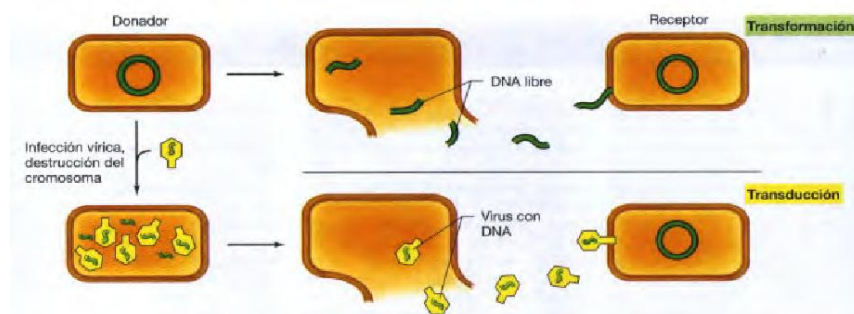


Figura 2.- Esquema de procesos de transferencia de material genético. Se muestra el proceso de transformación en la parte superior y el de transducción en la parte inferior (Brock y col., 2002).

1.4.3. Conjugación

La conjugación bacteriana es un proceso biológico en el que ocurre la transferencia de material genético de una célula donante a otra receptora mediante el contacto entre ellas a través de un pilus sexual que posee la célula donadora. A diferencia de los procesos de transferencia antes mencionados, transformación y transducción, la conjugación necesita contacto entre dos células vivas (*Sánchez y Guerrero, 1982*).

La conjugación es uno de los mecanismos más importantes realizados por las bacterias, permitiendo la adquisición de genes que codifican para la resistencia a diversos agentes antimicrobianos, incluidos los metales pesados. La conjugación y la transferencia de genes en *E. coli* está mediada por plásmidos. El conocimiento de los mecanismos de transferencia horizontal de la información genética entre bacterias ha permitido deducir que los plásmidos son los elementos de mayor contribución en la evolución bacteriana, debido a su capacidad para superar barreras genéticas. La transferencia de la resistencia por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones, son factores importantes que pueden contribuir con el incremento de cepas multiresistentes (*Sáenz y col., 2004*).

El proceso de conjugación provee ventajas competitivas a la bacteria y ocasiona serias implicaciones en la Salud Pública, ya que promueve el mantenimiento y la dispersión de genes que codifican resistencia a los metales pesados, entre bacterias relacionadas, en mayor y menor grado. El proceso

requiere de una región de transferencia, de más de 30 genes (genes *tra*), que generalmente abarcan más de 33 kb de la molécula plasmídica (*Alonso y col., 2005*).

Los plásmidos conjugativos son transferidos desde una célula donante hasta una receptora, mediante un complejo de formación del par conjugante (Mpf), llamado sistema de secreción tipo IV (T4SS). Este sistema es un complejo proteico asociado a la membrana celular, responsable de la construcción del pilus y de la transferencia del DNA. La proteína acopladora, unida a la membrana interna, conecta las proteínas del Mpf al relaxosoma citoplasmático, que es el sistema responsable del procesamiento del DNA antes y durante la transferencia por conjugación (*Alonso y col., 2005*).

Los sistemas de secreción del tipo IV son la maquinaria bacteriana más versátil. Estos complejos multiproteicos transmembranal pueden secretar proteínas y moléculas de ADN al medio o directamente a cualquier célula blanco procariota o eucariota (*Llosa y col., 2009*).

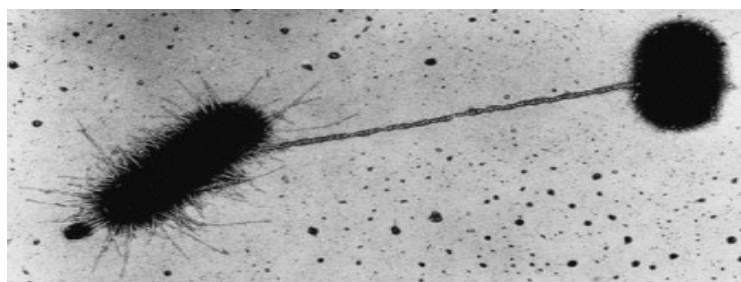


Figura 3.- Conjugación bacteriana. Se muestra a una célula donante con una célula receptora en contacto mediante el puente de conjugación (*Brock y col., 2002*)

1.5. Metales pesados

La naturaleza, los materiales, y los seres vivos, están constituidos por diversos átomos derivados de elementos químicos. Entre esos elementos se encuentran los que son esenciales como el carbono, el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, en mayor proporción; mientras que en una menor proporción, están el calcio, el hierro, el cobre y el aluminio (Navarro-Aviñó y col., 2007).

Los metales conforman alrededor del 75% de los elementos conocidos; ellos se encuentran en toda la biosfera, siendo elementos importantes tanto para los seres vivos, como para las industrias (Gadd, 2010). Las actividades de los humanos como minería, industrias, extracción petrolera, de gas, etc., han provocado un incremento en los niveles de metales tóxicos en el ambiente, acumulándose tanto en los ambientes terrestres como en los acuáticos, siendo asociados con efectos adversos en la biota y en la salud de los humanos (Cervantes y col., 2006; Gadd, 2010).



Figura 4.- Contaminación de aguas por metales pesados generados por industrias. (Tomado de: <http://www.ecologiaverde.com>)

Existen 13 metales y metaloides que son considerados contaminantes principales, los cuales son: Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, y Zn;

ellos se originan de fuentes naturales como rocas y minerales metalíferos, y también de introducción antropológica. Muchos metales son esenciales para la vida, como el caso del sodio, potasio, cobre, cobalto, calcio, zinc, magnesio, hierro y manganeso; pero todos pueden causar toxicidad cuando están presentes en concentraciones por encima del umbral (*Gadd, 2010*).

Muchos metales pesados, como el cromo, cobre, cobalto, molibdeno y zinc, entre otros, son necesarios en bajas cantidades en las células, a estos metales se les conoce como oligoelementos, pero una vez que se encuentran en niveles superiores a los requeridos, ejercen efectos tóxicos sobre las células. Mientras que aquellos metales pesados a los que no se les ha identificado una función específica en los requerimientos celulares, suelen ser altamente tóxicos, como es el caso del Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, y el Bi (*Navarro-Aviñó y col., 2007*).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos o pesados. Entre esos procesos se encuentran los que involucran: componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando la toxicidad de los metales, enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, transformándolos en formas menos tóxicas, y transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (*Cervantes y col., 2006*).

En el 2003, Lloyd y colaboradores realizaron una revisión sobre la reducción microbiana de metales y radionucleótidos, destacando el creciente interés de la acción microbiana para la reducción de metales y la participación

crucial que pueden jugar estas transformaciones en el ciclo, tanto de especies orgánicas como inorgánicas en un rango de ambientes, y del amplio rango de procesos innovadores de biotecnología. La revisión se enfoca principalmente en investigaciones de la reducción de metales como hierro (III), manganeso (IV), y otros metales más tóxicos como cromo (VI), mercurio (II), cobre (III), paladio (II), oro (III), plata (I), molibdeno (VI) y vanadio (V), destacando los principales estudios relacionados con la reducción de los metales mencionados anteriormente, de los posibles mecanismos utilizados para realizar dicha acción, y cuáles son las especies bacterianas capaces de llevar a cabo dichos procesos.

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen organismos resistentes y tolerantes a metales pesados. La habilidad de éstos para sobrevivir en ambientes con metales pesados, implica la adquisición de mecanismos que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento de ambientes contaminados con esos metales a través de procesos de inmovilización, o retención de las especies tóxicas (*Vullo, 2003*). Algunos mecanismos bacterianos de resistencia a metales pesados como el mercurio, cadmio, cromato, plata, níquel, zinc arsénico y telurito, han sido previamente estudiados (*Silver y Phung, 1996*).

1.5.1 Bario

El símbolo químico del Bario es Ba, su número atómico es 56 y tiene un peso atómico de 137.34. El bario ocupa el decimoctavo lugar en abundancia en la corteza terrestre, encontrándose en un 0.04%. Los compuestos de bario se obtienen de la minería y por conversión de dos minerales de Bario. Este metal es altamente reactivo con la gran mayoría de los no metales. El metal es dúctil y

maleable. El bario tiene una apariencia gris-blanca lustrosa. El cloruro de bario es una de las sales más utilizadas en las industrias, se emplea en la purificación de la sal, en la manufactura de cloruro e hidróxido de sodio, como fundente en aleaciones de magnesio, como ablandador de agua de calderas y en preparaciones medicinales (Tomado de:

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/ba.htm#ixzz1vLd1GJnYY>).

De forma natural, los niveles de Bario en el medio ambiente son muy bajos, pero altas cantidades de Bario pueden sólo ser encontradas en suelos y en alimentos, como frutos secos, algas, pescados y ciertas plantas (Tomado de:

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/ba.htm#ixzz1vLd1GJnYY>).

Los efectos sobre la salud que el bario puede causar dependen de la solubilidad del compuesto que contenga dicho metal. La toma de gran cantidad de Bario que es muy soluble en agua puede causar parálisis y en algunos casos incluso la muerte. Pequeñas cantidades de Bario soluble en agua puede causar en las personas dificultad al respirar, incremento de la presión sanguínea, aritmia, dolor de estómago, debilidad en los músculos, cambios en los reflejos nerviosos, inflamación del cerebro y el hígado, daño en los riñones y el corazón (Tomado de:

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/ba.htm#ixzz1vLd1GJnYY>)

1.5.2 Cobalto

El símbolo del cobalto es Co, número atómico 27 y un peso atómico de 58.93. Se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza y constituye, aproximadamente, el 0.001% del total de las rocas ígneas de la corteza terrestre.

El cobalto es hallado en meteoritos, estrellas, en el mar, en aguas dulces, suelos, plantas, animales y en los nódulos de manganeso encontrados en el fondo del océano. Se pueden encontrar trazas de cobalto en muchos minerales de hierro, níquel, cobre, plata, manganeso y zinc. Las plantas y los animales necesitan cantidades pequeñas de cobalto. El cuerpo adulto normal de 70 kg contiene un total de 1,1 mg de cobalto (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/co.htm#ixzz1vLqJnT9O>).

Las sales más comunes de cobalto son derivados del cobalto(II). La vitamina B₁₂ es un compuesto que contiene cobalto, frecuentemente encontrado en la naturaleza y que es muy importante para los seres vivos. Los compuestos de cobalto tienen gran variedad de aplicaciones industriales y comerciales. Entre sus aplicaciones más importantes están la preparación de aleaciones, pueden ser usados como catalizadores, y en la agricultura se utilizan para remediar la deficiencia de cobalto en el suelo y en la vegetación natural (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/co.htm#ixzz1vLqJnT9O>).

Las altas concentraciones de cobalto pueden ocasionar daños sobre la salud humana. Cuando respiramos elevadas concentraciones de cobalto se experimentan efectos negativos directamente en los pulmones, como asma y neumonía. Las plantas que crecen sobre suelos contaminados pueden acumular pequeñas partículas de cobalto, que al ser consumidas puede provocar vómitos, náuseas, problemas de visión, problemas de corazón y daño de la tiroides (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/co.htm#ixzz1vLqJnT9O>).

1.5.3 Cobre

El cobre (Cu), tiene el número atómico 29 y su peso atómico es 63,54. El cobre fue uno de los primeros metales usados por los humanos. Actualmente, este metal es muy utilizado por las industrias principalmente por sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas, y además por su gran abundancia en la corteza terrestre. La valencia más común encontrada en compuestos que contienen cobre, es la de 2+ (cúprico), pero 1+ (cuproso) es también frecuente; y la valencia 3+ se presenta sólo en algunos compuestos inestables (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cu.htm#ixzz1vLqU6A6R>).

De los cientos de compuestos de cobre, sólo unos cuantos son fabricados de manera industrial en gran escala. El más importante es el sulfato de cobre(II) pentahidratado o azul de vitriolo, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Las principales aplicaciones de los compuestos de cobre se encuentran en la agricultura, en especial como fungicidas e insecticidas, como pigmentos, en soluciones galvanoplásticas, en celdas primarias, como mordentes en teñido, y como catalizadores (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cu.htm#ixzz1vLqU6A6R>).

La absorción del Cobre es necesaria porque el éste es otro de los elementos traza esenciales para el metabolismo. Las concentraciones promedio de cobre para un adulto de 70 kg, son de 80 mg. Aunque los seres humanos pueden manejar concentraciones de cobre proporcionalmente altas, las concentraciones muy elevadas pueden también causar problemas de salud. La exposición durante largos periodos de tiempo al cobre pueden irritar la nariz, la

boca, los ojos y causar dolor de cabeza, de estómago, mareos, vómitos y diarreas. Una ingesta de grandes cantidades de cobre puede causar daño al hígado y los riñones e incluso la muerte (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cu.htm#ixzz1vLqU6A6R>).

1.5.4 Estroncio

El símbolo químico del estroncio es Sr, su número atómico 38 y tiene un peso atómico de 87.62. El estroncio es el menos abundante de los metales alcalinotérreos, puesto que la corteza de terrestre contiene sólo 0.042% de estroncio (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/sr.htm#ixzz1vLrNvBNN>).

Los compuestos con estroncio solubles en agua constituyen una amenaza mayor para la salud que los compuestos insolubles en agua. Las personas pueden estar expuestas a pequeños niveles de estroncio radiactivo por respirar aire o polvo, por alimentos, o agua, o por contacto con el suelo que contiene este elemento. Las concentraciones elevadas de estroncio en los alimentos contribuyen a que éste se acumule en el cuerpo. Los productos comestibles que contienen altas concentraciones de estroncio son los cereales, los vegetales de hojas y los productos lácteos (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/sr.htm#ixzz1vLrNvBNN>).

Cuando el Estroncio es tomado en alta concentración puede causar problema en el desarrollo de huesos, pero este efecto sólo ocurre cuando el

Estroncio es tomado en concentración de miles de ppm (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/sr.htm#ixzz1vLrNvBNN>).

1.5.5 Molibdeno.

El molibdeno (Mo) tiene el número atómico 42 y un peso atómico de 95.94; y es uno de los elementos de transición. La mayor parte del molibdeno obtenido proviene de minas donde su recuperación es el objetivo primario de la operación. El restante se obtiene como un subproducto de ciertas operaciones del beneficio del cobre. El molibdeno forma compuestos en los cuales puede presentar estados de oxidación: 0, 2+, 3+, 4+, 5+, 6+. No se ha observado como catión ionizable, pero se conocen especies catiónicas como el molibdenilo (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/mo.htm#ixzz1vLTLkbld>).

Basado en experimentación con animales, se ha propuesto que el molibdeno y sus compuestos son altamente tóxicos. Se ha reportado de alguna evidencia de disfunción hepática con hiperbilirubinemia en trabajadores crónicamente expuestos a una planta soviética de molibdeno y cobre. También puede provocar dolores de la articulación de las rodillas, manos, pies, deformidades en las articulaciones, eritemas, y edema en las articulaciones (Tomado de: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/mo.htm#ixzz1vLTLkbld>).

Como se mencionó anteriormente, el Mo es un metal esencial para los microorganismos, en un adulto promedio las concentraciones necesarias de molibdeno son menores a 20 mg. Este metal permite que se lleven a cabo algunas

actividades metabólicas de ellos. Por ejemplo, para las cianobacterias el Mo es esencial para la asimilación biológica de nitrógeno inorgánico. En un estudio realizado en Arizona (Estados Unidos), se compararon los requerimientos de Mo para la fijación del N₂ en dos especies de cianobacterias heterocísticas filamentosas (HC) para probar la hipótesis que las HC costeras requieren mayores concentraciones de Mo que las HC de aguas dulces para llevar a cabo la fijación del N. Este ejemplo muestra la dependiente co-limitación bioquímica que puede presentarse en el metabolismo de los microorganismos, ya que se requiere de Mo para que se pueda fijar el N (*Glass y col., 2010*).

En el presente trabajo se realizó la evaluación del fenotipo de resistencia a sales de Bario, Cobalto, Cobre, Estroncio y Molibdeno de 50 aislados de *E. coli*, de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU), y la capacidad que éstos tienen de transferir dichos genes de resistencia mediante procesos de conjugación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios a nivel internacional.

Han sido pocos los estudios a nivel mundial relacionados con infecciones urinarias generadas por bacterias en cuanto a su aislamiento, identificación, causas y resistencia ante los agentes antimicrobianos como antibióticos, detergentes, metales pesados, etc. El estudio de diversos microorganismos que realizan procesos de biorremediación, ha sido un tema de interés a nivel mundial, debido a su gran importancia para la recuperación de metales valiosos en la industria, o limpieza de aquellas áreas contaminadas por metales tóxicos. A continuación se recopila una serie de trabajos de relevancia que están relacionados con este tema.

En el año 1978, se realizó un estudio acerca de la resistencia a metales pesados y antibióticos en sedimentos de New York Bight, en zonas donde se desechan residuos tóxicos de industrias y basura, de zonas intermedias y de zonas alejadas de los puntos de desechos. Los autores reportan que en estas áreas se presentaban grandes poblaciones de *Bacillus sp.* y ensayaron la resistencia para mercurio (Hg) y ampicilina. Las poblaciones más resistentes a este metal pesado fueron las cepas que se aislaron de la zona que contenía mayor cantidad de desechos tóxicos, sugiriendo que la contaminación con metales pesados en las zonas de desechos ejercen una presión selectiva, provocando la selección de los microorganismos que presentan plásmidos que codifican resistencia a diversos agentes (Timoney y col., 1978).

En 1990 Ishibashi y colaboradores estudiaron la reducción del cromo hexavalente (cromato) a una forma menos tóxica del cromo, la forma trivalente, usando *Pseudomonas putida*. La reducción del cromato a una forma menos tóxica representa un uso potencial en procesos de biorremediación. En esta investigación se caracteriza la actividad de la cromato reductasa en una fracción de una proteína soluble de una cepa de *Pseudomonas putida*, reportando que la reducción del cromato requiere ya sea NADH o NADPH para tener una actividad máxima (Ishibashi y col., 1990).

En el año 2003, Paniagua y colaboradores determinan en 150 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, la resistencia a antibióticos y metales pesados. La CMI de plomo mostró una distribución bimodal con 2.6% de cepas medianamente sensibles (CMI = 200 µg/mL) y 97.4% de cepas resistentes (CMI = 800-3200 µg/mL). Todas las cepas fueron sensibles a cromato (CMI = 375 µg/mL) y resistentes a mercurio (CMI > 20 µg/mL) y a cadmio (CMI > 50 µg/mL). El 26% de las cepas fue sensible a arsenato (CMI = 200-400 µg/mL) y el 74% resistente (CMI = 800-1600 µg/mL). Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la elevada resistencia de las cepas de *Staphylococcus aureus* a la contaminación ambiental por metales pesados, que actúa como factor de selección para el fenotipo de resistencia (Paniagua y col., 2003)

En el 2007, Chávez y colaboradores reportan la resistencia a metales pesados en 48 cepas de *E. coli* de pacientes adultos. Todas presentaron resistencia a dos concentraciones probadas (1000 ppm y 2000 ppm) de metales pesados (Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg y V) (Chávez y col., 2007).

Pages y colaboradores, en el año 2008 reportan que *S. maltophilia* fue capaz de crecer en presencia de diversos metales pesados como: Cd, Pb, Co, Zn, Hg, Ag, selenito, telurito y uranilo, a concentraciones que variaban entre 0.1 y 50 mM, en medio TSB suplementado con las diferentes concentraciones de los metales. Además, *S. maltophilia* también presentó resistencia ante diversos antibióticos como kanamicina, gentamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico. Los autores reportan que además de la alta tolerancia a antimicrobianos, este microorganismo ha desarrollado por lo menos dos mecanismos diferentes de combatir su toxicidad (Pages y col., 2008).

Cortés y Fernández, en el 2009, reportan el aislamiento de microorganismos acumuladores de metales pesados, como el arsénico, cadmio, cobalto, cobre, cromo, mercurio, molibdeno, plata, plomo, selenio y zinc. Las muestras utilizadas provenían de una mina de la cual se aislaron 3 cepas, capaces de resistir a concentraciones que oscilaron entre 0,5 y 10 mM de sales de los metales pesados ensayados (Cortés y Fernández, 2009).

En el 2010, se publica un trabajo sobre la biosorción de cromo, arsénico y plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión, con las siguientes especies bacterianas: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*. Las cepas resultaron resistentes a concentraciones elevadas de cromo, arsénico y plomo, y muchas de las cepas lo pueden acumular en concentraciones hasta de 90 ppm (Mendoza-Hernández y col., 2010).

2.2 Estudios a nivel nacional.

En nuestro país, al igual que en el resto del mundo, ha habido un incremento en los reportes de bacterias resistentes a distintos agentes antimicrobianos en clínicas y hospitales. Sin embargo, los estudios en Venezuela relacionados con la resistencia a metales pesados de bacterias aisladas de infecciones, son escasos. A continuación se mencionan algunos de los trabajos más relevantes en los últimos años sobre este tema.

En el año 2002, Villarroel y colaboradores publican un estudio sobre la sensibilidad antimicrobiana de 538 cepas de *E. coli* identificadas en pacientes con infecciones urinarias atendidos en el Hospital Universitario de Caracas, en el período de enero hasta septiembre del año 2001. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad dieron que el 100% de las cepas no pudieron crecer en imipenem, un 96% en cefotaxima, un 95% en cefepima, un 94% en gentamicina, un 93% en cefixima y un 47% en trimetoprim/sulfametoxazol (TMP-SMX). Con estos resultados, concluyen que la sensibilidad de la bacteria a imipenem demuestra la utilidad de este antibiótico en presencia de alguna ITU, y recuerdan lo importante que es mantener estudios de vigilancia de la sensibilidad y resistencia bacteriana a diversos agentes antimicrobianos debido a las variaciones que pueden ocurrir a través del tiempo (*Villarroel y col, 2002*).

Alonso y colaboradores publican un trabajo en 2008, acerca de la caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas, en el cual se reporta que en

el contenido plasmídico se encontraban moléculas de tamaños variados. En el trabajo se reporta que un grupo bien definido de los plásmidos identificados, es responsable de la diseminación de un gran conjunto de genes de resistencia a distintos antimicrobianos (antibióticos, metales pesados, factores de virulencia, etc.), llegando a la conclusión que el abuso de algunos antibióticos ha sido la causa principal de selección de bacterias que presenten resistencia ante ellos, y se tiene que dichos plásmidos conjugativos, son candidatos ideales para explicar la multirresistencia de las bacterias a distintos antibióticos de uso cotidiano en los ambientes hospitalarios (*Alonso y col., 2008*).

Bracho y colaboradores reportan un trabajo acerca de la ocurrencia de resistencia a metales pesados, tales como mercurio, cromo, cadmio y níquel, en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de agua de varias playas del país. De las cepas analizadas, todas fueron resistentes a la concentración más alta ensayada para níquel y cadmio (1000 µg/ml), y para mercurio y cromo se obtuvo un porcentaje de resistencia de 29,78% y 40,42% respectivamente, para esta misma concentración. Los autores llegaron a la conclusión que la resistencia de estas cepas a niveles elevados de los compuestos ensayados, podrían ser ideales para ser utilizadas en procesos de biorremediación de ambientes contaminados por estos compuestos (*Bracho y col., 2005a*).

Otro trabajo, de los mismos investigadores, fue el de una evaluación de resistencia de *E. coli* a los mismos cuatro metales evaluados en las aguas recreacionales, pero esta vez con muestras aisladas de agua potable. Se obtuvo que para la mayor concentración ensayada (1000 mg/ml), el 100% de las cepas de

E. coli aisladas fue resistente al níquel; un 85% tanto en el caso del cadmio como el del cromo y un 75% de cepas resistentes al mercurio. Se halló que las concentraciones mínimas inhibitorias de crecimiento estaban comprendidas entre los rangos de los 200 y 1000 mg/L (*Bracho y col, 2005b*).

En el 2002, en el laboratorio de Biología de Plásmidos se estudiaron determinantes de la resistencia de metales pesados, tales como Bario, Cobre, Mercurio, Cobalto, Cadmio, Vanadio, Zinc, Estroncio, Molibdeno, etc. Utilizando medio rico LB suplementado con diversas concentraciones de las sales de metales pesados, se determinaron las CMI de las cepas analizadas para 12 de las 16 sales ensayadas, incluyendo cobalto y cobre. El autor reporta que la CMI para CoCl_2 fue de 2,5 mM, y para CuSO_4 fue de 3,6 mM. Para las sales que contenían Ba, Sr y Mo no se pudo determinar las CMI, indicando que la cantidad de las sales que debía utilizar para ensayar concentraciones más elevadas era excesiva (Tabla I) (*Bruzual, 2002*).

Tabla I. Tabla que muestra los resultados de ensayos fenotípicos de resistencia a metales pesados en medio sólido LB.

<i>Metal</i>	<i>E. coli</i> (J53-J62) (mM)	Otros géneros (mM)
Cadmio (CdCl ₂)	2,5	0,5 – 1,25
Cobalto (CoCl ₂)	2,5	1 – 2,25
Plomo (Pb(NO ₂) ₃)	9	2 – 3,5
Mercurio (HgCl ₂)	3	1 – 3
Cobre (CuSO ₄)	3,6	2 – 6
Níquel (NiSO ₄)	3	0,75 – 2,2
Telurito (K ₂ TO ₃)	0,04	--
Bario (BaCl ₂)	200 (NI)	--
Vanadio (VoSO ₄)	5	--
Molibdeno (MoO ₃)	80 (NI)	--
Tungsteno (NaW ₂)	80 (NI)	--
Estroncio (SrCO ₃)	40 (NI)	--
Cromo (Na ₂ CrO ₄)	5	--
Selenio (Na ₂ SeO ₄)	120	1 - 5
Arsenito (Na ₂ ArSO ₂)	2	--

Resistencias encontradas en las cepas de referencia de *E. coli* y resistencia reportadas para otros géneros bacterianos. “NI” indica que no se encontró inhibición de las cepas de referencia. Ensayo realizado en LB sólido (*Tomado de Bruzual, 2002*).

En el 2007, Angiolillo reporta la caracterización de los plásmidos presentes en cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas con resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol. En este trabajo se realizan los ensayos con antibióticos con cepas aisladas de muestras de urocultivos de pacientes ambulatorios, que presentaban ITU. Estas fueron caracterizadas e identificadas mediante técnicas microbiológicas, encontrando 50 cepas de *E. coli*. El autor concluyó que no parece existir relación entre los distintos plásmidos encontrados en las cepas causantes de ITU (*Angiolillo, 2007*). Estos aislados de *E. coli* no han sido caracterizados para ningún otro fenotipo.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios antes expuestos, demuestran en su gran mayoría, que tanto en aguas contaminadas, como en las infecciones del tracto urinario, *E. coli* está presente, siendo la bacteria que causa con mayor frecuencia las ITU. Los resultados reportados demuestran un incremento de la cantidad de bacterias con resistencia ante diversos antimicrobianos, debido a la presión selectiva a la que son sometidos constantemente.

Éstos antecedentes también resaltan la importancia de identificar las bacterias resistentes ante agentes antimicrobianos, que también son tóxicos para los humanos, como es el caso de los metales pesados.

Los genes que codifican proteínas que confieren resistencia hacia los metales pesados, que presentan algunas bacterias, pueden ser diseminados a través de los distintos procesos de transferencia horizontal de información genética (conjugación, transformación, etc.), lo cual provoca un incremento del número de bacterias, ya sean de la misma especie o entre especies distintas, que son capaces de sobrevivir en ambientes contaminados con metales pesados.

De esa manera, las bacterias resistentes se convierten en organismos que potencialmente pueden ser usados en procesos de biorremediación, debido a la capacidad de transformar o de absorber estos compuestos, representando grandes beneficios, tanto económicos, como ecológicos y de salud, para las personas que se encuentran constantemente expuestas a estos agentes contaminantes.

En este trabajo se propone utilizar técnicas microbiológicas y genéticas para la identificación de aquellas cepas resistentes a distintas sales de metales pesados, y evaluar la capacidad de transferencia de los genes que le confieren dicha resistencia. Se evaluará la resistencia ante sales de cinco metales pesados: Bario (Ba), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Estroncio (Sr) y Molibdeno (Mo), en aislados obtenidos a partir de pacientes con ITU. La elección de estos cinco metales pesados, se debe a que están comúnmente presentes en ambientes hospitalarios y clínicos.

4. OBJETIVOS

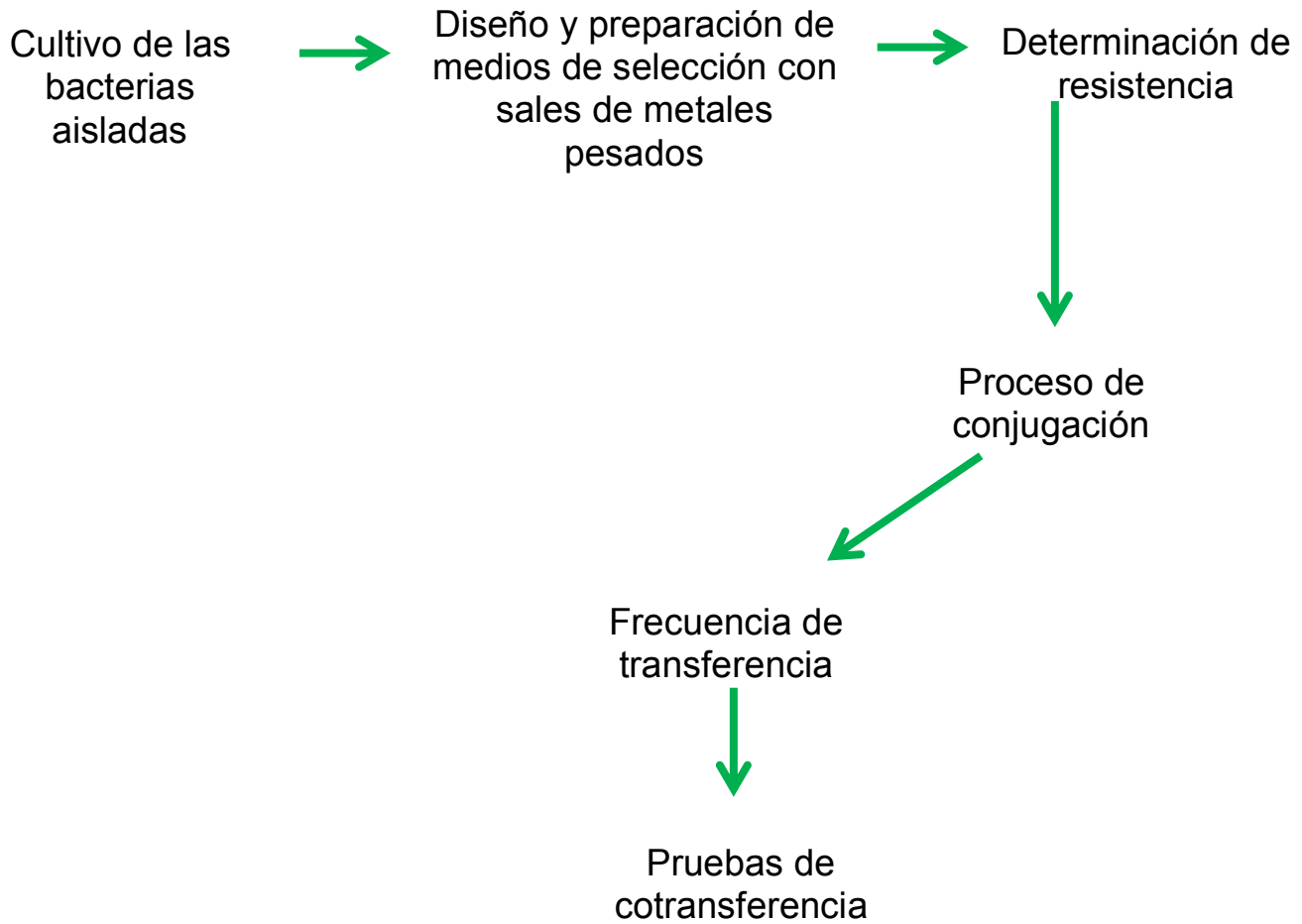
OBJETIVO GENERAL

- Determinar el fenotipo de resistencia a sales de metales pesados en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes de la comunidad con infecciones en el tracto urinario (ITU), y caracterizar la capacidad de transmisibilidad de los determinantes de resistencia detectados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar el fenotipo bacteriano de resistencia a sales de Bario, Cobalto, Cobre, Estroncio y Molibdeno.
- 2.- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los metales en los aislados bacterianos que presentaron alguna(s) resistencia(s).
- 3.- Determinar la capacidad de transferencia de los determinantes de resistencia a las sales de los metales pesados analizados.
- 4.- Evaluar fenotípicamente si ocurre la cotransferencia de diversos marcadores.

5. PLAN DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

- Cultivo de las bacterias aisladas de pacientes con infecciones urinarias

Se utilizaron 50 aislados para realizar el trabajo, los cuales se encuentran almacenados en el Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental. Éstos, previamente identificados como *Escherichia coli*, fueron aislados de pacientes que acudieron a consulta en el Centro Médico Docente La Trinidad (CMDLT), con infecciones en el tracto urinario, en el período correspondiente a los meses de mayo a junio del 2006. Como control para los experimentos realizados, se utilizó la cepa de *E. coli* K12 J62-2 número 131, del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), de genotipo F⁻, RIF^R, *his*⁻, *lac*⁻, *pro*⁻, *tri*⁻.

Todos los aislados utilizados en este trabajo fueron previamente caracterizado por Angiolillo en el 2007, para algunos marcadores de resistencia ante antibióticos. En la tabla II se muestran los resultados.

Tabla II. Porcentajes de resistencia de los 50 aislados de pacientes ambulatorios con ITU.

AMK	AMP	SAM	CEP	CIP	GEN	NIT	PIP	TZP	SXT
0% R	92% R	4% R	52% R	54% R	20% R	92% R	90% R	92% R	94% R

R= Resistencia. AMK= Amikacina, AMP= Ampicilina, SAM= Ampicilina/Sulbactam, CEP= Cefalotina, CIP= Ciprofloxacina, GEN= Gentamicina, NIT= Nitrofurantoina, PIP= Piperacilina, TZP= Piperacilina/Tazobactam, SXT= Trimetoprim/Sulfametoxazol.

- **Preparación de los medios de cultivo suplementados con diversas concentraciones de sales de metales pesados**

Se utilizó el medio Luria-Bertani o LB, un medio rico, sólido que contiene por litro de agua destilada: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura; 5g de cloruro de sodio, el cual aportó la fuente de sales inorgánicas; y 15g de agar (Coello y col., 2003). Los medios fueron esterilizados utilizando un autoclave a 15 lb, a 121°C por 15 minutos.

Se prepararon medios de cultivo suplementados con rifampicina y ampicilina, con la finalidad de verificar el fenotipo de las cepas.

- **Evaluación fenotípica de los aislados de *E. coli* utilizadas**

Se preparó un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las células suplementados con las siguientes sales: BaCl₂ (Cloruro de Bario), CuSO₄ (Sulfato de Cobre), CoCl₂ (Cloruro de Cobalto), SrCl₂ (Cloruro de Estroncio) y Na₂MoO₄

(Molibdato de Sodio) (Figura 5). Todas estas se prepararon en una solución madre a una concentración de 1M, a excepción de SrCl_2 la cual fue de 0,5 mM, con pH 7.

Para preparar las placas de medio LB suplementadas con las sales de metales pesados a distintas concentraciones finales, se utilizó la fórmula (1), de acuerdo al volumen que se deseaba preparar (Figura 6).

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (1)$$



Figura 5.- Stock de las sales de metales pesados utilizados para los experimentos.

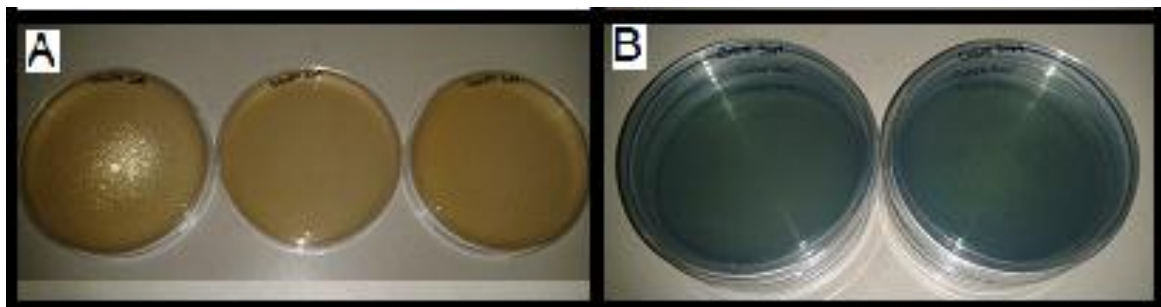


Figura 6.- Ejemplos de placas con medio LB suplementadas con sales de metales pesados. A: Placas de medio LB suplementadas con CoCl_2 2mM. B: Placas de medio LB suplementadas con CuSO_4 .

- **Conjugación bacteriana**

Se sembró por agotamiento una alícuota de las cepas de interés (tanto donante como receptora) y se incubaron por 24 horas a 37 °C.

Pasado el tiempo, se tomó una colonia y se inocularon tubos con 2 mL de caldo LB por separado, se colocaron en un rotor a una temperatura de 37°C durante toda la noche para su crecimiento. Al día siguiente, se tomaron 0,2 mL de cada una de las cepas y se colocaron en értulas conteniendo 9,8 mL de caldo LB, éstas fueron colocadas en agitación a 37°C hasta que la cepa donante alcanzó 80 UK, y la cepa receptora llegó a 60 UK (aproximadamente 1×10^8 y $7,5 \times 10^7$ células/ml, respectivamente).

Al alcanzar las UK correspondientes, se preparó la mezcla de conjugación; tomando 0,1 mL de la cepa donante, y 0,4 mL de la cepa receptora en un tubo eppendorf estéril, junto con 0,5 mL de caldo LB. Luego ésta mezcla de conjugación se incubó a 37°C por 24 horas.

Simultáneamente, se realizaron diluciones seriadas de las cepas, con la finalidad de calcular el título de cada una. Las diluciones fueron sembradas según el patrón mostrado en la figura 7.

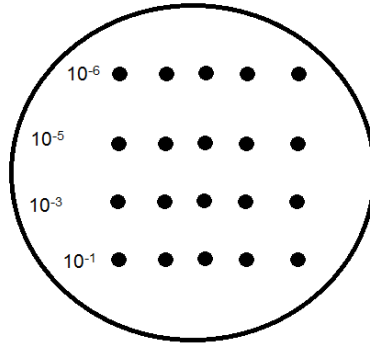


Figura 7.- Patrón de las siembras en las placas de Petri, de las distintas diluciones y determinación de los títulos.

Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas de las mezclas de conjugación, para sembrar las transconjugantes en medio LB suplementado con RIF y las concentraciones de sales de metales pesados a los que el crecimiento de la cepa control fue inhibido, y éstas luego fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Las diluciones de las mezclas de conjugación fueron sembradas según el patrón mostrado en la figura 8.

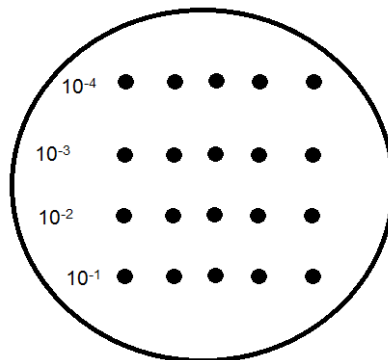


Figura 8.- Patrón de las siembras en las placas de Petri, de las distintas diluciones de las mezclas de conjugación.

Frecuencia de transferencia en la conjugación.

El título se calculó como indica la fórmula (2).

$$\text{Título} = \frac{\text{UFC} \times \text{Dilución}}{\text{Volumen de siembra}} \quad (2)$$

La frecuencia de transferencia se calculó mediante la fórmula (3).

$$\text{Frecuencia de conjugación} = \frac{\text{Título transconjugante}}{\text{Título donante}} \quad (3)$$

- Pruebas de cotransferencia de diversos marcadores

Las transconjugantes que fueron obtenidas, se sembraron en medio con agar LB suplementado con las sales de metales pesados a las concentraciones para la cual se vió inhibido el crecimiento de la cepa receptora utilizada para el proceso de conjugación, *E. coli* J62-2. En este caso con las sales que contenían Co y Cu. Se suplementaron placas de medio LB con CoCl_2 2mM, CoSO_4 5 mM y Rifampicina. Luego de sembrar las transconjugantes, éstos se incubaron a 37°C por 24 h.

7. Resultados

7.1. Determinación de la resistencia hacia distintos antimicrobianos

Con la finalidad de evaluar la capacidad de algunas bacterias de presentar el fenotipo de resistencia a determinadas sales de metales tóxicos, en este estudio se realizaron pruebas con 50 aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de pacientes ambulatorios que presentaban infecciones en el tracto urinario. Con la finalidad de realizar estos ensayos fue necesario ratificar los fenotipos de los aislados previamente, mediante pruebas en medio LB suplementado con antibiótico, entre otros medios.

En el 2007, Angiolillo, en su T.E.G., determinó el perfil de resistencia ante distintos antibióticos, de los 50 aislados de *E. coli* causantes de I.T.U. utilizados en el presente trabajo. El autor seleccionó que el 100% presentaron resistencia a SXT, y en esa población determinó que un 90% presentó resistencia a AMP, 86% a PIP, y 74% a CEP. Para otros antibióticos se presentaron valores de resistencia intermedios o bajos como 54% de resistencia a CIP, 24% a GEN, 14% a SAM, 8% de resistencia tanto a NIT como a TYP y un 2% de resistencia a AMK. Los resultados de este autor se resumen en la tabla II en la sección de materiales y métodos.

Angiolillo también determinó que el 100% de éstos aislados presentaron sensibilidad a Rifampicina. Para verificar el fenotipo de los aislados se realizaron pruebas con medio LB suplementado con RIF, y LB suplementado con AMP. Los ensayos mostraron que efectivamente de los 50 aislados el 90% presentó

resistencia ante la AMP y a su vez el 100% de ellos fue sensible a RIF. En la tabla III se muestran los resultados de dichas pruebas.

Tabla III. Verificación del perfil de resistencia a Ampicilina y a Rifampicina de los aislados bacterianos analizados.

Aislado	LB	AMP	RIF	Aislado	LB	AMP	RIF
3113	+	+	-	3992	+	+	-
3166	+	+	-	4068	+	+	-
3171	+	-	-	4086	+	+	-
3203	+	+	-	4144	+	+	-
3213	+	+	-	4259	+	+	-
3280	+	+	-	4271	+	+	-
3324	+	+	-	4282	+	+	-
3372	+	+	-	4315	+	+	-
3373	+	+	-	4340	+	+	-
3438	+	+	-	4375	+	+	-
3456	+	+	-	4388	+	+	-
3569	+	+	-	4454	+	+	-
3574	+	+	-	4549	+	-	-
3611	+	+	-	4553	+	+	-
3663	+	-	-	4569	+	+	-
3719	+	-	-	4570	+	-	-
3741	+	+	-	4617	+	+	-
3742	+	+	-	4638	+	+	-
3757	+	+	-	4662	+	+	-
3792	+	+	-	4688	+	+	-
3799	+	+	-	4689	+	+	-
3844	+	+	-	4715	+	+	-
3875	+	+	-	4729	+	+	-
3920	+	+	-	4739	+	+	-
3979	+	+	-	4741	+	+	-

+ = Crecimiento - = No crecimiento. LB: Luria-Bertani. AMP: Ampicilina. RIF: Rifampicina. Los aislados se encuentran identificados con números, y se ubican en la primera y cuarta columna.

Se debe destacar que la cepa control utilizada para todos los experimentos, *E. coli* J62-2, presentó sensibilidad ante AMP y resistencia a RIF.

7.2. Determinación de la resistencia de las distintas sales de metales pesados.

Una vez recuperados los aislados bacterianos objeto de estudio, y ratificados todos los fenotipos requeridos, se procedió a determinar los porcentajes de cepas que presentan resistencia a diversas sales de metales pesados.

Se realizaron ensayos fenotípicos de concentraciones variadas de 5 sales: Cloruro de bario, cloruro de cobalto, sulfato de cobre, cloruro de estroncio y molibdato de sodio. Todas las sales fueron preparadas con agua MiliQ. En algunos casos (cloruro de bario y molibdato de sodio) fue necesario calentar la solución con el agua para su completa disolución. Se prepararon stock de 1M, y solo en el caso de cloruro de estroncio la solución madre fue preparada a 0,5 M. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de éstas sales.

7.2.1. Bario

Para los ensayos de fenotipo de resistencia con cloruro de bario, las cepas fueron sembradas en medio LB suplementado con distintas concentraciones de ésta sal. De las concentraciones ensayadas con cloruro de bario, se encontró que los 50 aislados presentaron un 100% de crecimiento ante la concentración más alta (500 mM). En la tabla IV se muestran los resultados.

Tabla IV. Resultados obtenidos en los ensayos a los 50 aislados, con distintas concentraciones de cloruro de bario.

Aislado	Cloruro de Bario					
	10 (mM)	15 (mM)	20 (mM)	25 (mM)	250 (mM)	500 (mM)
3113	+	+	+	+	+	+
3166	+	+	+	+	+	+
3171	+	+	+	+	+	+
3203	+	+	+	+	+	+
3213	+	+	+	+	+	+
3280	+	+	+	+	+	+
3324	+	+	+	+	+	+
3372	+	+	+	+	+	+
3373	+	+	+	+	+	+
3438	+	+	+	+	+	+
3456	+	+	+	+	+	+
3569	+	+	+	+	+	+
3574	+	+	+	+	+	+
3611	+	+	+	+	+	+
3663	+	+	+	+	+	+
3719	+	+	+	+	+	+
3741	+	+	+	+	+	+
3742	+	+	+	+	+	+
3757	+	+	+	+	+	+
3792	+	+	+	+	+	+
3799	+	+	+	+	+	+
3844	+	+	+	+	+	+
3875	+	+	+	+	+	+
3920	+	+	+	+	+	+
3979	+	+	+	+	+	+
3992	+	+	+	+	+	+
4068	+	+	+	+	+	+
4086	+	+	+	+	+	+
4144	+	+	+	+	+	+
4259	+	+	+	+	+	+
4271	+	+	+	+	+	+
4282	+	+	+	+	+	+
4315	+	+	+	+	+	+
4340	+	+	+	+	+	+
4375	+	+	+	+	+	+
4388	+	+	+	+	+	+
4454	+	+	+	+	+	+
4549	+	+	+	+	+	+
4553	+	+	+	+	+	+
4569	+	+	+	+	+	+

4570	+	+	+	+	+	+
4617	+	+	+	+	+	+
4638	+	+	+	+	+	+
4662	+	+	+	+	+	+
4688	+	+	+	+	+	+
4689	+	+	+	+	+	+
4715	+	+	+	+	+	+
4729	+	+	+	+	+	+
4739	+	+	+	+	+	+
4741	+	+	+	+	+	+

+ = Crecimiento

En la figura 9, se muestra el resumen de los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas de resistencia a diversas concentraciones de cloruro de bario. Los resultados demostraron que el 100% de los aislados y la cepa control (*E. coli* J62-2), presentaron capacidad de crecimiento a todas las concentraciones ensayadas.

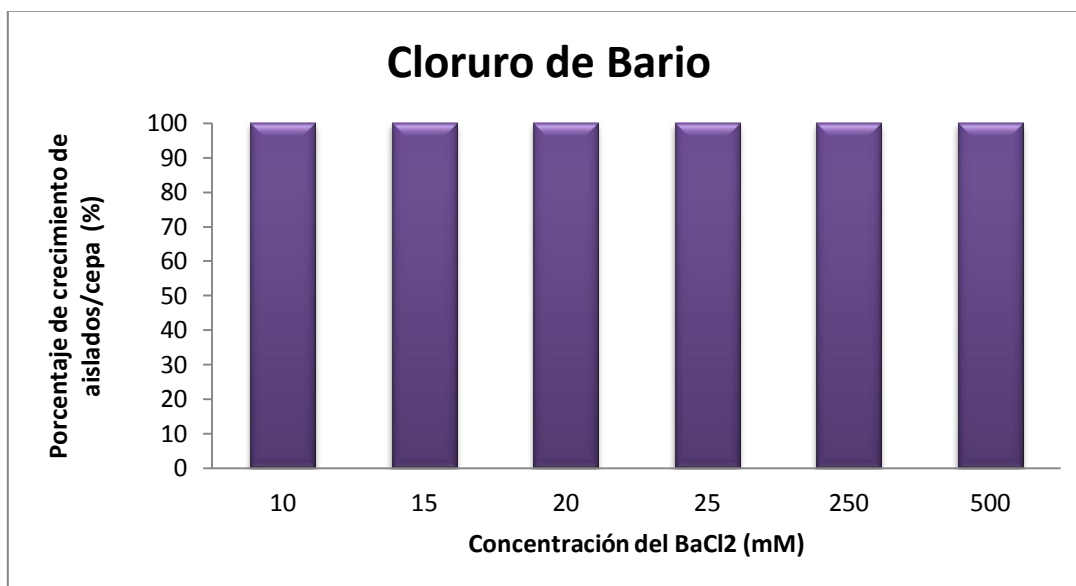


Figura 9.- Resultados obtenidos en los ensayos de fenotipo de los 50 aislados y la cepa control, a diversas concentraciones de cloruro de bario.

7.2.2. Cobalto

Para los análisis con cloruro de cobalto, se sembraron placas que contenían medio LB suplementado con diversas concentraciones de ésta sal de metal pesado.

En los ensayos fenotípicos de resistencia con diversas concentraciones de cloruro de cobalto, los resultados demostraron que un 24% de los aislados ensayados presentaron resistencia a una concentración 2 mM. De los 50 aislados, 12 presentaron resistencia a ésta concentración, mientras que los 38 restantes presentaron sensibilidad (tabla V). Cabe destacar que con una concentración 2 mM CoCl_2 la cepa control no fue capaz de crecer.

Tabla V. Resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos de los 50 aislados y la cepa control, a diversas concentraciones de cloruro de cobalto.

Aislado/ Cepa	Cloruro de cobalto		Aislado/ Cepa	Cloruro de cobalto	
	1 (mM)	2 (mM)		1(mM)	2 (mM)
J62-2	+	-	4068	+	-
3113	+	-	4086	+	-
3166	+	-	4144	+	-
3171	+	+	4259	+	-
3203	+	-	4271	+	+
3280	+	-	4282	+	+
3324	+	-	4315	+	-
3372	+	-	4340	+	+
3373	+	-	4375	+	-
3438	+	-	4388	+	-
3456	+	-	4454	+	-
3569	+	-	4549	+	-
3574	+	+	4553	+	-
3611	+	-	4569	+	-
3663	+	+	4570	+	+
3719	+	+	4617	+	+
3741	+	+	4638	+	-
3757	+	-	4662	+	-
3792	+	-	4688	+	-
3799	+	-	4689	+	-

3844	+	-	4715	+	+
3875	+	-	4729	+	+
3920	+	-	4739	+	-
3979	+	-	4741	+	-
3992	+	-			

+ = Crecimiento. - = No crecimiento.

En la figura 10 se muestra de forma gráfica los resultados de la tabla V, con el porcentaje de aislados que presentaron resistencia a las concentraciones de cloruro de cobalto ensayadas. El 24 % de los aislados presentó resistencia a CoCl_2 cuando se encuentra a una concentración de 2 mM, la mayor concentración que fue ensayada y a la cual la cepa control es sensible de acuerdo a los resultados obtenidos, siendo incapaz de crecer.

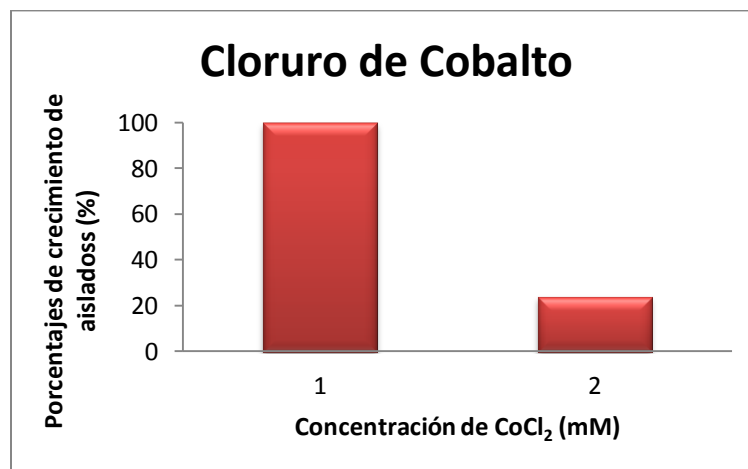


Figura 10.- Porcentaje de aislados resistentes a las concentraciones de CoCl_2 ensayadas.

7.2.3. Cobre

Los resultados de crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones ensayadas con sulfato de cobre se muestran en la tabla VI. Según los resultados obtenidos se puede observar que 23 (46%) de los 50

aislados fue capaz de crecer a la mayor concentración ensayada en este trabajo (5 mM).

Tabla VI. Resultados obtenidos al realizar ensayos a los 50 aislados con concentraciones variadas de sulfato de cobre.

Aislado/ Cepa	Sulfato de Cobre				
	1 (mM)	2 (mM)	3 (mM)	4 (mM)	5 (mM)
J62-2	+	+	+	+	-
3113	+	+	+	+	+
3166	+	+	+	+	-
3171	+	+	+	+	-
3203	+	+	+	+	+
3280	+	+	+	+	-
3324	+	+	+	+	-
3372	+	+	+	+	+
3373	+	+	+	+	+
3438	+	+	+	+	-
3456	+	+	+	+	-
3569	+	+	+	+	+
3574	+	+	+	+	-
3611	+	+	+	+	+
3663	+	+	+	+	-
3719	+	+	+	+	-
3741	+	+	+	+	-
3757	+	+	+	+	+
3792	+	+	+	+	+
3799	+	+	+	+	+
3844	+	+	+	+	+
3875	+	+	+	+	-
3920	+	+	+	+	-
3979	+	+	+	+	-
3992	+	+	+	+	-
4068	+	+	+	+	-
4086	+	+	+	+	-
4144	+	+	+	+	+
4259	+	+	+	+	-
4271	+	+	+	+	+
4282	+	+	+	+	+
4315	+	+	+	+	-
4340	+	+	+	+	-
4375	+	+	+	+	-

4388	+	+	+	+	-
4454	+	+	+	+	+
4549	+	+	+	+	+
4553	+	+	+	+	+
4569	+	+	+	+	-
4570	+	+	+	+	+
4617	+	+	+	+	+
4638	+	+	+	+	-
4662	+	+	+	+	-
4688	+	+	+	+	+
4689	+	+	+	+	+
4715	+	+	+	+	+
4729	+	+	+	+	+
4739	+	+	+	+	+
4741	+	+	+	+	-

+ = Crecimiento. - = No crecimiento.

En la figura 11 se muestra en forma gráfica los valores obtenidos para los porcentajes de aislados que fueron resistentes a las concentraciones de sulfato de cobre utilizadas en este trabajo. Los valores nos permiten concluir que un 46% de los aislados presentó resistencia a la mayor concentración del metal pesado empleada, siendo entonces 5 mM de CuSO_4 la CMI para *E. coli*.

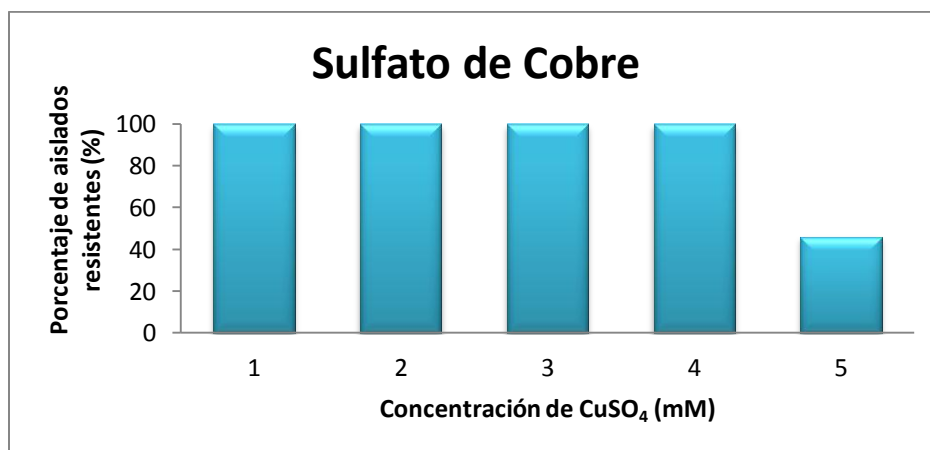


Figura 11.- Porcentajes de aislados que presentaron resistencia a las distintas concentraciones de CuSO_4 ensayadas.

7.2.4. Estroncio

Para los ensayos fenotípicos con cloruro de estroncio, se suplemento medio rico LB con diversas concentraciones de la sal. Los resultados demuestran que los 50 aislados presentaron capacidad de crecer a todas las concentraciones ensayadas (Tabla VII).

Tabla VII. Resultados de los ensayos fenotípicos de diversas concentraciones de cloruro de estroncio.

Aislado/ Cepa	Cloruro de Estroncio					
	10 (mM)	15 (mM)	20 (mM)	25 (mM)	50 (mM)	100 (mM)
J62-2	+	+	+	+	+	+
3113	+	+	+	+	+	+
3166	+	+	+	+	+	+
3171	+	+	+	+	+	+
3203	+	+	+	+	+	+
3213	+	+	+	+	+	+
3280	+	+	+	+	+	+
3324	+	+	+	+	+	+
3372	+	+	+	+	+	+
3373	+	+	+	+	+	+
3438	+	+	+	+	+	+
3456	+	+	+	+	+	+
3569	+	+	+	+	+	+
3574	+	+	+	+	+	+
3611	+	+	+	+	+	+
3663	+	+	+	+	+	+
3719	+	+	+	+	+	+
3741	+	+	+	+	+	+
3742	+	+	+	+	+	+
3757	+	+	+	+	+	+
3792	+	+	+	+	+	+
3799	+	+	+	+	+	+
3844	+	+	+	+	+	+
3875	+	+	+	+	+	+
3920	+	+	+	+	+	+
3979	+	+	+	+	+	+
3992	+	+	+	+	+	+
4068	+	+	+	+	+	+
4086	+	+	+	+	+	+

4144	+	+	+	+	+	+
4259	+	+	+	+	+	+
4271	+	+	+	+	+	+
4282	+	+	+	+	+	+
4315	+	+	+	+	+	+
4340	+	+	+	+	+	+
4375	+	+	+	+	+	+
4388	+	+	+	+	+	+
4454	+	+	+	+	+	+
4549	+	+	+	+	+	+
4553	+	+	+	+	+	+
4569	+	+	+	+	+	+
4570	+	+	+	+	+	+
4617	+	+	+	+	+	+
4638	+	+	+	+	+	+
4662	+	+	+	+	+	+
4688	+	+	+	+	+	+
4689	+	+	+	+	+	+
4715	+	+	+	+	+	+
4729	+	+	+	+	+	+
4739	+	+	+	+	+	+
4741	+	+	+	+	+	+

+=Crecimiento. -=No crecimiento.

En la figura 12 se representa gráficamente los resultados obtenidos en los ensayos con cloruro de estroncio, mostrando que el 100 % de los aislados presentó capacidad de crecimiento a todas las concentraciones ensayadas con ésta sal.

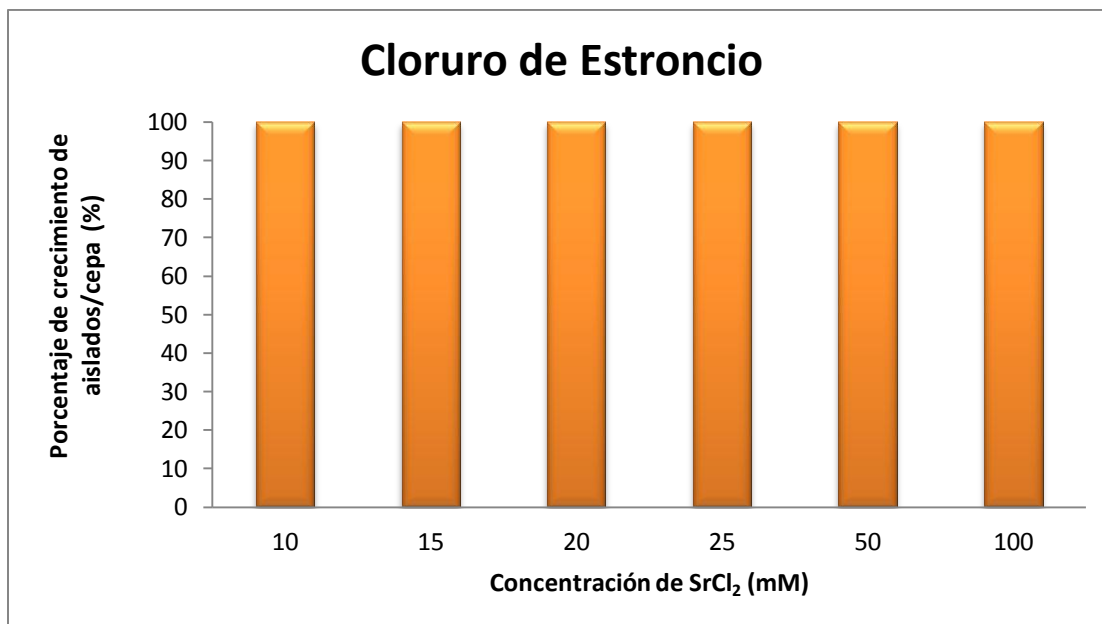


Figura 12.- Porcentajes de aislados resistentes a las concentraciones de cloruro de estroncio ensayadas.

7.2.5. Molibdeno

Para realizar las pruebas de fenotipo con molibdato de sodio, se utilizó medio LB suplementado con las distintas concentraciones de la sal.

Al realizar las pruebas fenotípicas con molibdato de sodio se obtuvo que los 50 aislados presentaron capacidad de crecimiento hasta la mayor concentración ensayada. En la tabla VIII se muestran los resultados.

Tabla VIII. Resultados de las pruebas de fenotipo realizadas a los aislados utilizando molibdato de sodio.

Aislado/Cepa	Molibdato de Sodio					
	10(mM)	20(mM)	100(mM)	200(mM)	300(mM)	350(mM)
J62-2	+	+	+	+	+	+
3113	+	+	+	+	+	+
3166	+	+	+	+	+	+
3171	+	+	+	+	+	+
3203	+	+	+	+	+	+
3213	+	+	+	+	+	+

3280	+	+	+	+	+	+
3324	+	+	+	+	+	+
3372	+	+	+	+	+	+
3373	+	+	+	+	+	+
3438	+	+	+	+	+	+
3456	+	+	+	+	+	+
3569	+	+	+	+	+	+
3574	+	+	+	+	+	+
3611	+	+	+	+	+	+
3663	+	+	+	+	+	+
3719	+	+	+	+	+	+
3741	+	+	+	+	+	+
3757	+	+	+	+	+	+
3792	+	+	+	+	+	+
3799	+	+	+	+	+	+
3844	+	+	+	+	+	+
3875	+	+	+	+	+	+
3920	+	+	+	+	+	+
3955	+	+	+	+	+	+
3979	+	+	+	+	+	+
3992	+	+	+	+	+	+
4068	+	+	+	+	+	+
4086	+	+	+	+	+	+
4144	+	+	+	+	+	+
4269	+	+	+	+	+	+
4271	+	+	+	+	+	+
4282	+	+	+	+	+	+
4315	+	+	+	+	+	+
4340	+	+	+	+	+	+
4375	+	+	+	+	+	+
4388	+	+	+	+	+	+
4454	+	+	+	+	+	+
4549	+	+	+	+	+	+
4553	+	+	+	+	+	+
4569	+	+	+	+	+	+
4570	+	+	+	+	+	+
4617	+	+	+	+	+	+
4638	+	+	+	+	+	+
4662	+	+	+	+	+	+
4688	+	+	+	+	+	+
4689	+	+	+	+	+	+
4715	+	+	+	+	+	+

+=Crecimiento

En la figura 13 se representan los resultados de las pruebas fenotípicas obtenidos para molibdato de sodio. El 100 % de los aislados presentó capacidad de crecimiento hasta la concentración más alta ensayada con la sal.

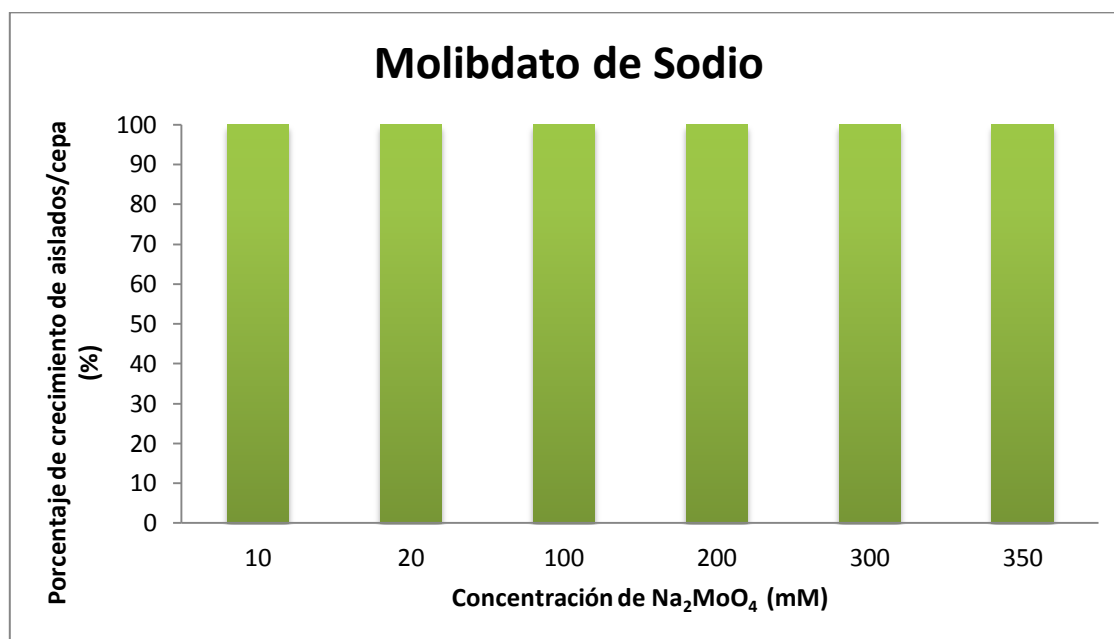


Figura 13.- Porcentaje de aislados resistentes a las diversas concentraciones de molibdato de sodio.

7.2.6 Resultados globales de los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia a diversas sales de metales pesados.

De todos los resultados obtenidos de los ensayos fenotípicos de sensibilidad a diversas sales de metales pesados, se pueden resumir los valores presentados en la tabla IX. Las sales para las cuales se obtuvo la CMI en las condiciones ensayadas y se observó crecimiento de algunos aislados bacterianos a concentraciones mayores a la CMI, fueron cloruro de cobalto y sulfato de cobre, 2 mM y 5 mM respectivamente.

Tabla IX. Resumen de los resultados de las pruebas fenotípicas de los 50 aislados.

Sal	Concentración (mM)	% Aislados con crecimiento	% Aislados sin crecimiento
Cloruro de Bario	10	100	0
	15	100	0
	20	100	0
	25	100	0
	250	100	0
	500	100	0
Cloruro de Cobalto	1	100	0
	2	24	76
Sulfato de Cobre	1	100	0
	2	100	0
	3	100	0
	4	100	0
	5	46	54
Cloruro de Estroncio	10	100	0
	15	100	0
	20	100	0
	25	100	0
	50	100	0
	100	100	0
Molibdato de Sodio	10	100	0
	20	100	0
	100	100	0
	200	100	0
	300	100	0
	350	100	0

En azul se muestran los porcentajes de aislados con crecimiento diferentes de 100%. En rojo se muestran los porcentajes de aislados sin crecimiento distintos a 0.

En la figura 14 se muestran los porcentajes de los aislados que presentaron crecimiento a la mayor concentración de las sales ensayadas. La mayor concentración de cloruro de bario: 500 mM, cloruro de cobalto: 2 mM, sulfato de cobre: 5 mM, cloruro de estroncio: 100 mM y molibdato de sodio: 350 mM.

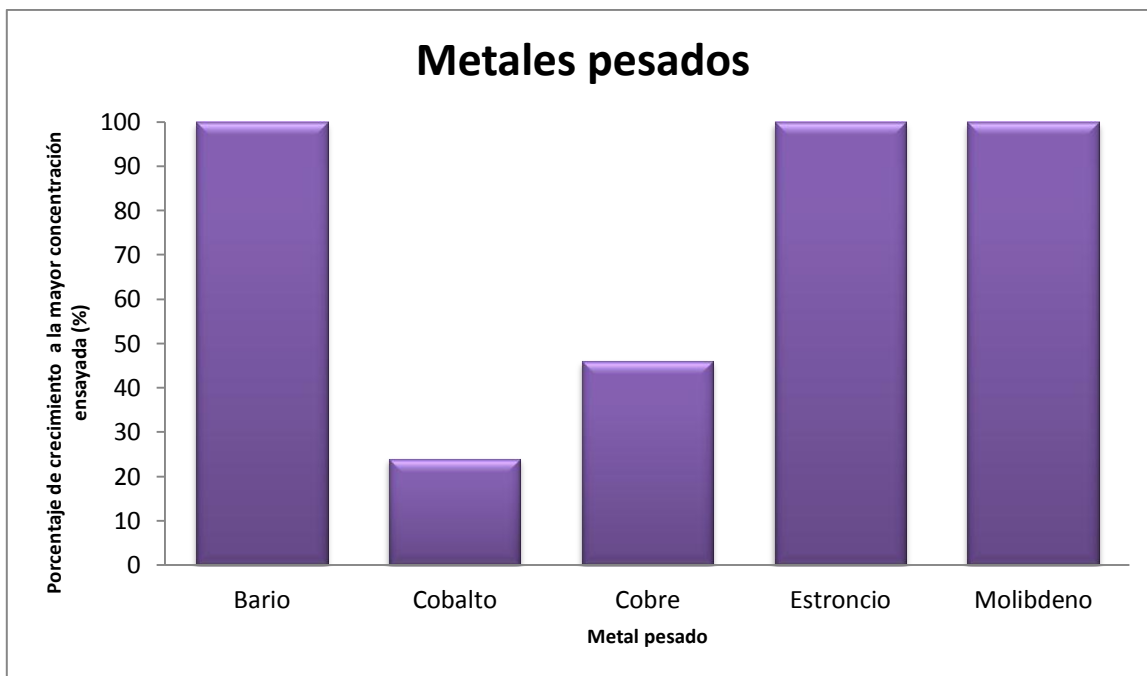


Figura 14.- Resultados de las pruebas fenotípicas realizadas para los 50 aislados, de la concentración más alta ensayada para cada sal.

Los resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos demostraron que con Cloruro de bario $BaCl_2$, Cloruro de estroncio ($SrCl_2$) y Molibdato de sodio (Na_2MoO_4), no se alcanzó la CMI. No se ensayaron valores mayores debido a que las concentraciones utilizadas ya eran altas y el volumen a agregar al medio de cultivo era excesivo. Este problema no pudo solucionarse puesto que no era posible preparar un stock más concentrado debido a la solubilidad de las sales. Entre los 50 aislados, 6 (12%) presentaron resistencia tanto a cloruro de cobalto, como a sulfato de cobre. Éstos aislados fueron: 4721, 4282, 4570, 4617, 4715 y 4729. En la tabla X se muestran los resultados de fenotipo de resistencia ante cloruro de cobalto 2 mM y sulfato de cobre 5 mM.

Para Cloruro de cobalto (CoCl₂) y Sulfato de cobre (CuSO₄) sí fue posible determinar las CMI, por lo que entonces se procedió a desarrollar los siguientes objetivos siguientes en base a estos fenotipos. Para alcanzar dichos objetivos se realizaron experimentos de conjugación, utilizando cloruro de cobalto y sulfato de cobre en el medio de selección de transconjugantes y se utilizó como cepa receptora a *E. coli* J62-2.

Tabla X.- Fenotipo de resistencia de los 50 aislados a cloruro de cobalto 2 mM y sulfato de cobre 5 mM.

Aislado	Cloruro de Cobalto (2 mM)	Sulfato de Cobre (5 mM)	Aislado	Cloruro de Cobalto (2 mM)	Sulfato de Cobre (5 mM)
3113	S	R	3992	S	S
3166	S	S	4068	S	S
3171	R	S	4086	S	S
3203	S	R	4144	S	R
3213	S	S	4259	S	S
3280	S	S	4271	R	R
3324	S	S	4282	R	R
3372	S	R	4315	S	S
3373	S	R	4340	R	S
3438	S	S	4375	S	S
3456	S	S	4388	S	S
3569	S	R	4454	S	R
3574	R	S	4549	S	R
3611	S	R	4553	S	R
3663	R	S	4569	S	S
3719	R	S	4570	R	R
3741	R	S	4617	R	R
3742	S	S	4638	S	S
3757	S	R	4662	S	S
3792	S	R	4688	S	R
3799	S	R	4689	S	R
3844	S	R	4715	R	R
3875	S	S	4729	R	R
3920	S	S	4739	S	R
3979	S	S	4741	S	S

S= Sensible R=Resistente

7.3. Resultados de las conjugaciones. Determinación de la frecuencia de transferencia de genes de resistencia.

En los casos en que se logró determinar el valor de crecimiento la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de la cepa control que se utilizaría como receptora (*E. coli* J62-2), se realizaron los procesos de conjugación con los distintos aislados que presentaron resistencia evidenciada como capacidad de crecimiento.

A fines de determinar la capacidad de movilización de los marcadores que confieren resistencia ante cloruro de cobalto (2 mM) y sulfato de cobre (5 mM), los experimentos de conjugación fueron llevados a cabo con los aislados: 3113, 3171, 3203, 3372, 3373, 3569, 3611, 3663, 3719, 3741, 3757, 3792, 3799, 3844, 4144, 4271, 4282, 4340, 4454, 4549, 4553, 4570, 4617, 4688, 4689, 4715, 4729 y 4739, los cuales resultaron portadores del fenotipo de resistencia según las pruebas fenotípicas.

7.3.1. Cloruro de cobalto

Se realizaron las pruebas siguiendo el protocolo indicado en la sección de materiales y métodos, utilizando como marcador de selección cloruro de cobalto 2 mM. Se utilizaron como donantes a los aislados 3171, 3574, 3663, 3719, 3741, 4271, 4282, 4340, 4570, 4617, 4715, 4729 de la tabla V.

En la tabla XI se resumen los resultados de los títulos de las donantes y de los títulos de las transconjugantes en cada caso, y a su vez se determinaron los

valores de la frecuencia de transferencia de los genes que confieren resistencia a la concentración del cloruro de cobalto que se ensayó.

Se encontró que el menor valor de frecuencia de transferencia se obtuvo con la transconjugante T3574, la cual fue de $2,13 \times 10^{-6}$ células transconjugantes/células donantes, esto indica que de cada millón de células, al menos 2 fueron capaces de transferir los genes de resistencia a la concentración de 2 mM de cloruro de cobalto. Mientras que la concentración más elevada de la frecuencia de transferencia se registró en T3171, presentando un valor de $8,4 \times 10^{-2}$ células transconjugantes/células donantes, lo cual indica que de cada 100 células, al menos 8 fueron capaces de transferir los genes de resistencia a la concentración antes mencionada de la sal del metal pesado.

Tabla XI. Resultados de las conjugaciones realizadas con el marcador de cloruro de cobalto 2 mM.

Aislado	Título donante (cel/ml)	Título transconjugante (cel/ml)	Frecuencia de transferencia (cel trans/cel donantes)
T3171	1,00E+08	8,40E+06	8,40E-02
T3574	8,47E+08	1,80E+03	2,13E-06
T3663	1,33E+08	4,00E+05	3,01E-03
T3719	1,00E+08	2,60E+05	2,60E-03
T3741	5,00E+08	3,60E+05	7,20E-04
T4271	7,28E+08	1,02E+07	1,40E-02
T4282	1,00E+08	3,00E+04	3,00E-04
T4340	5,00E+08	3,40E+05	6,80E-04
T4570	6,80E+08	2,80E+06	4,12E-03
T4617	8,26E+08	3,80E+06	4,60E-03
T4715	1,67E+08	1,67E+04	1,00E-04
T4729	1,30E+09	4,40E+06	3,38E-03

En rojo y azul se resaltan el mayor valor y el menor valor de frecuencia de transferencia respectivamente.

7.3.2. Sulfato de Cobre

Se realizó el proceso de conjugación con sulfato de cobre 5 mM como marcador de selección. Para ello se utilizaron como donantes a los aislados: 3113, 3203, 3372, 3373, 3569, 3611, 3757, 3792, 3799, 3844, 4144, 4271, 4282, 4454, 4549, 4553, 4570, 4617, 4688, 4689, 4715, 4729 y 4739.

En la tabla XII se muestran los resultados de los títulos de las donantes y de los títulos de las transconjugantes. Se determinaron los valores de la frecuencia de transferencia de los genes que confieren resistencia a la concentración del sulfato de cobre que se ensayó.

El menor valor de la frecuencia de transferencia obtenido se obtuvo con la transconjugante T3611, siendo de $3,03 \times 10^{-6}$ células transconjugantes/ células donantes, indicando que de cada millón de células donantes, al menos 3 fueron capaces de transferir los genes que le confieren resistencia a sulfato de cobre 5 mM. Mientras que el valor más alto se presentó con T4144, siendo de $6,52 \times 10^{-3}$ células transconjugantes/ células donantes, indicando que de cada 1000 células donantes, aproximadamente 6 de ellas fueron capaces de transferir genes de resistencia a la concentración de la sal del metal pesado.

Tabla XII. Resultados de las conjugaciones realizadas con el marcador de cloruro de cobalto 2 mM.

Aislado	Título donante (cel/ml)	Título transconjugante (cel/ml)	Frecuencia de transferencia (cel trans/cel donantes)
T3113	1,98E+08	2,00E+05	1,01E-03
T3203	7,60E+08	8,40E+05	1,11E-03
T3372	5,00E+08	6,00E+05	1,20E-03

T3373	5,00E+08	1,75E+04	3,50E-05
T3569	4,00E+08	6,00E+04	1,50E-04
T3611	6,60E+08	2,00E+03	3,03E-06
T3757	7,60E+08	5,60E+05	7,37E-04
T3792	6,40E+08	2,33E+03	3,64E-06
T3799	1,70E+08	7,50E+04	4,41E-04
T3844	2,00E+08	4,60E+04	2,30E-04
T4144	5,60E+08	3,65E+06	6,52E-03
T4271	6,57E+08	2,40E+06	3,65E-03
T4282	4,80E+08	6,80E+05	1,42E-03
T4388	4,40E+08	7,00E+05	1,59E-03
T4454	4,00E+08	1,00E+04	2,50E-05
T4549	5,60E+08	5,00E+04	8,93E-05
T4553	4,50E+08	1,00E+04	2,22E-05
T4570	4,00E+08	5,14E+05	1,29E-03
T4617	8,68E+08	3,20E+05	3,69E-04
T4689	4,00E+08	3,40E+04	8,50E-05
T4715	6,40E+08	7,50E+05	1,17E-03
T4729	1,22E+09	4,20E+05	3,44E-04
T4739	9,20E+08	1,33E+05	1,45E-04

En rojo y azul se resaltan el mayor valor y el menor valor de frecuencia de transferencia respectivamente.

7.4. Pruebas de cotransferencia

Con la finalidad de determinar si al realizar el proceso de conjugación con los distintos aislados, se movilizaron varios marcadores de resistencia, se realizaron pruebas de cotransferencia. A fin de verificar fenotipo de las transconjugantes obtenidas se realizaron pruebas fenotípicas en MM y MH, encontrando que el 100 % de las transconjugantes fueron incapaces de crecer en ninguno de éstos medios. Estos resultados confirmaron que efectivamente se obtuvieron transconjugantes puesto que la cepa receptora, en pruebas previas era incapaz de crecer en estos medios. Se realizaron controles con las donantes

verificando fenotipo en medio LB suplementado con RIF, obteniendo que el 100% fueron incapaces de crecer, lo cual confirmó la sensibilidad ante este antibiótico.

Los diversos marcadores ensayados en las pruebas de cotransferencia fueron la resistencia a cloruro de cobalto 2 mM y sulfato de cobre 5 mM concentraciones a las cuales la receptora no era capaz de crecer, mientras que algunas donantes crecían en al menos uno de éstos marcadores. Los resultados se resumen en la tabla XIII. De 29 transconjugantes, 6 fueron capaces de crecer en medio suplementado con CoCl_2 2 mM, mientras que 17 fueron resistentes a sulfato de cobre 5 mM, el resto de las transconjugantes fueron capaces de crecer en medios suplementados con ambas sales y no solamente en el seleccionado en el ensayo de conjugación. El 100% de los aislados que presentaron en las ensayos previos, fueron capaces de cotransferir los genes de resistencia tanto para CoCl_2 como para CuSO_4 .

Tabla XIII. Resultados obtenidos de las pruebas de cotransferencia de genes de resistencia a diversas sales de metales pesados.

Transconjugante	LB	CoCl_2 2 mM	CuSO_4 5 mM	CoCl_2 2mM/ CuSO_4 5mM
T3113-Cu	+	S	R	S
T3171-Co	+	R	S	S
T3203-Cu	+	S	R	S
T3372-Cu	+	S	R	S
T3373-Cu	+	S	R	S
T3569-Cu	+	S	R	S
T3574-Co	+	R	S	S
T3611-Cu	+	S	R	S
T3663-Co	+	R	S	S
T3719-Co	+	R	S	S
T3741-Co	+	R	S	S
T3757-Cu	+	S	R	S
T3792-Cu	+	S	R	S
T3799-Cu	+	S	R	S
T3844-Cu	+	S	R	S

T4144-Cu	+	S	R	S
T4271-Co/Cu	+	R	R	R
T4282-Co/Cu	+	R	R	R
T4340-Co	+	R	S	S
T4454-Cu	+	S	R	S
T4549-Cu	+	S	R	S
T4553-Cu	+	S	R	S
T4570-Co/Cu	+	R	R	R
T4617-Co/Cu	+	R	R	R
T4688-Cu	+	S	R	S
T4689-Cu	+	S	R	S
T4715-Co/Cu	+	R	R	R
T4729-Co/Cu	+	R	R	R
T4739-Co/Cu	+	S	R	S

+: Crecimiento. R=Resistencia (crecimiento) S=Sensibilidad (No crecimiento). Co=Resistencia a Cobalto 2mM. Cu=Resistencia a Cobre 5mM. Co/Cu=Resistencia a Cobalto 2mM y Cobre 5mM.

8. Discusión

En la naturaleza se encuentran millones de microorganismos a los cuales están expuestos los seres vivos diariamente. Muchos de estos microorganismos tienen papeles geológicos importantes en la biósfera, particularmente en las áreas de biotransformación y en los ciclos biogeoquímicos, en la descomposición de material, las transformaciones de metales y minerales, en la formación de los sedimentos y el suelo, entre otras (*Gadd, 2010*).

En humanos, es poco lo que se conoce de los sistemas de resistencia o tolerancia a los metales. Muchos de los metales pesados, o algunos de sus componentes, no son correctamente metabolizados y pueden suponer un riesgo para la salud de los seres vivos y el medio ambiente, aunque algunos de ellos son elementos esenciales (en pequeñas cantidades) en los seres humanos, indiferentemente de su toxicidad. En general, los metales pesados son tóxicos para los seres vivos después de estar expuestos a ellos por tiempos prolongados o concentraciones elevadas. Muchos de los metales, como el cobre, están presentes diariamente en la vida de los seres humanos (por ejemplo en las monedas), sin embargo existen pocos reportes sobre los efectos tóxicos que puede causar. Dependiendo de las propiedades físicas del metal, sus efectos varían. Metales como el cobalto pueden afectar el metabolismo asociado al calcio, otros como el plomo pueden afectar el sistema nervioso (*Nies, 1999*).

Muchas de las proteínas que están involucradas en la resistencia a metales en bacterias, presentan homología con una variedad de proteínas en humanos, lo cual sugiere que podría existir un efecto de tolerancia a los metales en los

humanos. En bacterias, la presencia de éstos sistemas de detoxificación de compuestos tóxicos podrían deberse a la necesidad de las mismas de adaptarse en situaciones de estrés (Bruzual, 2002) (Lovley y Coates, 1997).

Aún cuando los mecanismos para evitar la toxicidad de los metales en los humanos no son bien entendidos, los mecanismos bacterianos si lo son. Una idea concebida hace tiempo es utilizar estos mecanismos, o las bacterias que poseen éstos mecanismos, en provecho del hombre, tanto en el área de la salud como en el área ambiental. Suena lógico entonces, utilizar bacterias encontradas usualmente en el organismo humano, y entender bien sus sistemas de detoxificación. Entre éstas bacterias se encuentran en primer lugar *Escherichia coli*.

En un estudio realizado en el Laboratorio de Biología de Plásmidos, utilizando muestras provenientes de pacientes ambulatorios que presentaban ITU, y que asistieron a consulta en el CMDLT, se reportó que el 67% de los microorganismos causantes de infección fueron identificados como *E. coli* (Angiolillo, 2007). A partir de estos aislados, se utilizaron 50 identificados como *E. coli* para la realización del presente trabajo.

Se ha reportado que el uso irracional de fármacos para tratar las ITU, ha causado que se presente un ambiente selectivo sobre las poblaciones bacterianas resistentes, trayendo como consecuencia la diseminación de los genes que confieren multirresistencia ante distintos antimicrobianos, entre los que se incluyen los antibióticos y probablemente los metales pesados (Pedroza y col., 2001). Esto

ha provocado una dificultad en cuanto al uso de los antimicrobianos para controlar las infecciones. En los últimos años las interacciones de bacterias con los iones de metales pesados han despertado un interés considerable, debido a los grandes beneficios que éstos brindarían si son utilizados de manera adecuada (Timoney y col., 1978).

Las investigaciones sobre la resistencia de los microorganismos es un tema de mucho interés y frecuentemente estudiado en las áreas que se encuentran expuestas a grandes cantidades de estos elementos tóxicos. Se han reportado trabajos relacionados con la resistencia hacia metales pesados y los mecanismos que utilizan para contrarrestar los efectos nocivos. Especies como *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium sp.*, *Burkholderia sp.* y *Escherichia coli* han sido estudiadas, encontrando que presentan resistencia a metales como cromo, plomo, mercurio, arsénico, hierro, cobalto, molibdeno, cobre, vanadio, entre otros (Ishibashi y col., 1990) (Paniagua y col., 2003) (Chávez y col., 2007) (Mendoza-Hernández y col., 2010). Otros trabajos han reportado bacterias Gram positivas resistentes a diversos metales y que además son capaces de bioacumular algunos elementos, como por ejemplo Ag (Cortés y Fernández, 2009).

Los resultados de las CMI para CoCl_2 y CuSO_4 reportados por Bruzual varían de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Los valores previos de la CMI fueron para Co de 2,5 mM, y para Cu de 3,6 mM (tabla I); mientras que los resultados obtenidos en este trabajo fueron Co 2mM y Cu 5 mM. Esto puede

deberse a que la interacción entre los metales y los microorganismos dependen de los factores externos, como son el pH y el medio utilizado (*Bruzual, 2002*).

La interacción entre los microorganismos y los metales pesados varía de acuerdo a los factores intrínsecos de las bacterias y el medio ambiente en que se encuentran, ya que éstos condicionan la toxicidad de las especies metálicas. Algunos microorganismos poseen propiedades que les permiten realizar cambios en la especiación de los metales, cambios en su toxicidad y en su movilidad. Sin embargo, la interacción entre los metales y los microorganismos también puede afectar el crecimiento microbiano, su actividad metabólica y en consecuencia su sobrevivencia (*Gadd, 2010*).

Los metales pesados se encuentran entre los contaminantes más abundantes en aguas y zonas residuales industriales. Los efectos tóxicos y mutagénicos de estos elementos inorgánicos, así como la capacidad de los organismos de bioacumularlos, conllevan a provocar efectos nocivos a los ecosistemas. La exposición de los microorganismos a los ecosistemas contaminados con metales y con desechos domésticos, ha permitido la aparición y la selección de bacterias resistentes a varios antibióticos y metales pesados. Esta respuesta microbiana constituye un fenómeno ambiental de selección natural para la sobrevivencia de los agentes biológicos.

Los metales están directa o indirectamente involucrados en todos los aspectos del crecimiento microbiano, el metabolismo y la diferenciación. Y como se mencionó anteriormente, los metales y sus compuestos interactúan con los

microorganismos de diversas formas dependiendo de la especie del metal, el organismo y el ambiente, mientras que los componentes estructurales y la actividad metabólica también influyen en la especiación de los metales y por lo tanto en su solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y toxicidad.

En la bibliografía se ha descrito que los metales presentan un rango de toxicidad hacia los microorganismos, y aun cuando se ha descrito que los efectos tóxicos pueden darse a partir de eventos geoquímicos naturales, los efectos tóxicos en las comunidades microbianas están asociadas comúnmente a la contaminación antropológica o a la redistribución de metales tóxicos en ecosistemas acuáticos y terrestres (*Gadd, 2010*).

En este trabajo se eligieron 5 metales pesados, para llevar a cabo los objetivos planteados: Bario, Cobalto, Cobre, Estroncio y Molibdeno. La razón de la elección de estos 5 elementos fue debido a su presencia en ambientes clínicos, en las aguas, y la posible presencia de estos en muchos de los alimentos que consumen los seres vivos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los genes que codifican proteínas que confieren resistencia a los metales pesados, tales como Co y Cu están presentes en aislados de *E. coli* de humanos, en este caso de pacientes de la comunidad, que presentaban ITU y que pudieron no estar continuamente sometidas a presión selectiva de antimicrobianos. De las 5 sales de metales pesados que se utilizaron en los ensayos iniciales de fenotipo, los resultados muestran que se pudo alcanzar una CMI con las sales de Co (2mM) y Cu (5mM), con un 24% de las 50 muestras con fenotipo resistente a CoCl_2 y un 46% a CuSO_4 .

Para las sales de Ba, Sr y Mo, no fue posible hallar las CMI para la cepa control con las condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio. Se sugiere que se realicen a futuro ensayos con otras sales de estos metales pesados, con diferentes capacidades de disolución, o realizar los ensayos utilizando otros medios de cultivo, ya que los factores externos, principalmente el pH, afectan a la especiación química y a la movilidad de muchos metales pesados. Los cambios de pH pueden influir fuertemente en la adsorción o desorción por las sustancias orgánicas, por lo que las sustancias tóxicas entonces pueden precipitar o disolverse de acuerdo a ésta condición. Otros factores son aquellos relacionados directamente con el sistema biológico, como lo es la actividad metabólica de los microorganismos en la movilidad de los elementos tóxicos (Tomado de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6978/02INTRODUCCION.pdf?sequence=2>).

La concentración mayor de $BaCl_2$ que se ensayó en los experimentos fue de 500 mM. La cepa control y los 50 aislados bacterianos analizados (100%) fueron capaces de crecer en presencia de ésta concentración añadida de sales de bario en el medio de cultivo, aun cuando no se ha estimado cual es la concentración real en estas condiciones. Los efectos del Ba en las células bacterianas es un tema que ha sido estudiado previamente en varias especies de bacterias. Muchas bacterias son capaces de incorporar metales pesados en su interior celular, debido a que presentan estructuras similares a otros elementos esenciales para el metabolismo microbiano. Estudios previos han sugerido que el paso de elementos químicos similares al interior celular, es posible en bacterias, por ejemplo como es

el caso del calcio, el estroncio y el bario, que son elementos divalentes. Se ha reportado que algunas esporas de especies de *Bacillus* pueden acumular bario y estroncio, debido a que estos metales se unen a fracciones en las capas que podrían ser idénticas al sitio de unión del calcio (*Foerster y Foster, 1966*). Considerando estos reportes podemos sugerir que es posible que en nuestro caso el Ba haya sido utilizado por los aislados de *E. coli*, sustituyendo algún otro elemento divalente que presente sitios de unión similares, y por tanto cumpliendo con alguna actividad metabólica del microorganismo, y además algo similar pudo haber ocurrido en el caso del Sr y Mo.

En nuestro estudio la concentración mayor ensayada para SrCl_2 , y utilizando como microorganismo a *E. coli*, todas las bacterias fueron capaces de crecer. No fue posible realizar ensayos a mayores concentraciones debido a la falta de solubilidad de la sal que permitiera tener una solución madre más concentrada. Se conoce poco sobre los efectos tóxicos que este metal pesado ejerce sobre los microorganismos, sin embargo se han realizado estudios con diversas especies bacterianas, como *Shewanella oneidensis*, la cual se reportó que era capaz de crecer hasta una concentración de 180 mM en medio LB (*Brown y col., 2006*). Sin embargo en nuestro estudio, la mayor concentración ensayada para Sr fue de 200 mM y el crecimiento de los microorganismos no fue inhibido.

El Mo es un elemento traza esencial para el metabolismo de los microorganismos, ya que en muchos casos actúa como cofactor en muchas reacciones bioquímicas. Las concentraciones ensayadas en el presente trabajo para Na_2MoO_4 , no permitieron la determinar la CMI. La mayor concentración que

se ensayó de éste metal fue de 350 mM. Como en el caso de Sr y Ba, debido a las condiciones experimentales implementadas no se pudieron realizar las pruebas a concentraciones más elevadas.

En nuestro país, las investigaciones sobre los microorganismos resistentes a diferentes antimicrobianos, se han enfocado principalmente a la resistencia a antibióticos. Se han realizado pocos estudios sobre la resistencia hacia metales pesados presentes en cepas aisladas de ambientes acuáticos. En el 2005 se publica un trabajo sobre la resistencia a los metales pesados en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de agua de varias playas del país. Todas las cepas fueron resistentes a la concentración más alta ensayada para níquel y cadmio (1000 µg/ml), para mercurio un 29,78% de resistencia y en el caso del cromo 40,42% para esta misma concentración. Otro trabajo, de los mismos investigadores, se centró en la evaluación de la resistencia de *E. coli* en muestras aisladas de agua potable. Los autores reportan que para la mayor concentración ensayada (1000 mg/ml), el 100% fue resistente al níquel; un 85% para cadmio y cromo, y un 75% de cepas resistentes al mercurio (*Bracho y col, 2005b*).

En nuestro trabajo, las muestras no fueron aisladas de ambientes naturales, ni acuáticos ni terrestres, sino de seres humanos con ITU. Los resultados nos permiten señalar que se encontró resistencia hacia metales pesados en un 58% de los aislados analizados, del cual un 12% presentó resistencia a CoCl_2 , un 34% a CuSO_4 , mientras que el otro 12% presentó resistencia para ambos metales pesados. Para las concentraciones ensayadas de

BaCl₂, SrCl₂ y Na₂MoO₄ el control y el 100% de los aislados fueron capaces de crecer.

Diversos estudios han demostrado que la resistencia a metales pesados en bacterias de diferentes géneros puede estar mediada por plásmidos, y en muchos casos éstos plásmidos presentan de forma conjunta, genes que codifican proteínas que confieren resistencia ante los antibióticos. En los casos que estos genes están agrupados en el mismo plásmido, es razonable asumir que los agentes antimicrobianos y el uso inadecuado de cualquiera de ellos, pueden ser considerados como la presión selectiva para mantener los plásmidos en las poblaciones de bacterias que los contienen.

El uso indiscriminado de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades en la población, ha causado el desarrollo de resistencia microbiana a estos compuestos. Este comportamiento de los microorganismos frente a los antibióticos ha tenido un efecto colateral en la selección y expresión de la resistencia a los metales pesados, a consecuencia de la presencia de genes que confieren resistencia y que se encuentran en un mismo plásmido. La conjugación es el mecanismo más estudiado en la transferencia de genes de forma horizontal, entre bacterias y se ha implicado como el principal mecanismo responsable de la dispersión de genes que representan alguna ventaja para el microorganismo (Martínez y col., 2010) (Top, 1990).

Frecuentemente, se ha reportado que las cepas de *Escherichia coli* son resistentes a metales pesados, y los genes responsables de esta resistencia a

menudo, puede ser transferida mediante conjugación. En *E. coli* se ha reportado la presencia de plásmidos que contienen genes que confieren resistencia a metales como mercurio, níquel, arsenato, cobalto y cobre (*Harnett y Gyles, 1984*).

En el presente trabajo se reporta que 29 aislados entre todos los ensayados en el proceso de conjugación, fueron capaces de transferir los genes que codifican para la resistencia hacia Co y/o Cu. De los 29 aislados, 6 exhibían fenotipo resistencia ante CoCl_2 2mM y transfirieron mediante el proceso de conjugación los genes de resistencia ante Co; 17 presentaron resistencia CuSO_4 5 mM y fueron capaces de transferir genes de resistencia ante Cu, y los 6 aislados restantes presentaron resistencia para ambas sales a dichas concentraciones.

Los resultados obtenidos indican que los 6 aislados que presentaron genes que codifican proteínas de resistencia para ambos metales, Co y Cu, el 100% fue capaz de cotransferir, mediante el proceso de conjugación plasmídica, ambas resistencias.

Los resultados obtenidos sugieren que el 100% de los aislados ensayados en este trabajo para el proceso de conjugación, tiene los genes que codifican para las proteínas, así como toda la maquinaria necesaria para llevar a cabo dicho proceso, mediante los sistemas T4SS. Así, los sistemas proteicos responsables de la resistencia a Co y Cu, están codificados en plásmidos movilizables, que fueron capaces de ser transferidos a una cepa receptora.

Los valores obtenidos para la frecuencia de transferencia de genes que confieren resistencia ante Co oscilaron entre $2,06 \times 10^{-6}$ y $8,4 \times 10^{-2}$ células

transconjugantes/células donantes, y para Cu los valores de la frecuencia de transferencia oscilaron de $3,03 \times 10^{-6}$ a $6,52 \times 10^{-3}$ células transconjugantes/células donantes. Estos valores entran en el rango de plásmidos de baja (10^{-6}) y alta frecuencia (10^{-2}) de transferencia, respectivamente, sugiriendo que se está en presencia de diferentes moléculas plasmídicas con diferente maquinaria de conjugación.

En los trabajos previos del laboratorio, se realizaron pruebas de conjugación con los aislados utilizados en este trabajo, para estudiar la transferencia de genes que confieren resistencia a SXT, teniendo como resultado que el 87,5% (14 de 16) de las donantes fue capaz de transferir los genes de resistencia a SXT, mientras que todas las donantes (100%) resistentes a AMP y GEN, fueron capaces de transferir los genes de resistencia ante dichos antibióticos (*Angiolillo, 2007*). De las 16 transconjugantes obtenidos por éste autor, 6 coinciden con las transconjugantes que se obtuvieron en nuestro trabajo (T3171, T3574, T3663, T3719, T3741, T3792 y T3799). El 100% de las donantes en nuestro trabajo fueron capaces de transferir eficientemente los genes que conferían resistencia ante Co y Cu.

Las propiedades que poseen los microorganismos para llevar a cabo biotransformaciones, expulsión de especies nocivas, y la bioacumulación de elementos tóxicos, es un tema de evidente interés ya sea a nivel ecológico, ó biológico ó de salud. La identificación de aquellos microorganismos resistentes, así como el conocimiento de los mecanismos involucrados en dichas resistencias, si son utilizados de forma adecuada, podrían emplearse en procesos de

biorremediación de áreas contaminadas. A nivel clínico, es necesario tomar medidas en cuanto a la incorrecta medicación de antibióticos, puesto que como se ha señalado en muchos trabajos, la presión selectiva obliga a que aquellos marcadores que confieren resistencia ante un antibiótico, generalmente codificados en plásmidos, sean transferido a otras células, pasando no solamente los genes de resistencia ante un antibiótico, si no ante múltiples antimicrobianos, entre los que se incluyen los desinfectantes y los metales pesados. Los metales pesados pueden encontrarse en el agua, en los alimentos, en los insecticidas, en partículas de polvo suspendidas en el aire, en algunos casos las sales de metales pesados son utilizadas como desinfectantes químicos, etc. Esto puede traer consecuencias negativas para la salud de los humanos, ya que si una bacteria que es capaz de almacenar grandes concentraciones de metales tóxicos, infecta a los seres vivos, afectará seriamente su salud y su calidad de vida. Por esta razón, es necesario que se sigan explorando estos sistemas a nivel nacional ya que no ha sido ampliamente investigado.

9. CONCLUSIONES

- De los análisis de fenotípicos de los 50 aislados, ante 5 sales de metales pesados, se obtuvo que 12 (24%) fueron resistentes a CoCl_2 2 mM, y 23 (46%) fueron resistentes a CuSO_4 5 mM.
- Todos los aislados y el control fueron capaces de crecer en presencia de Ba (500 mM), Sr (200 mM) y Mo (250 mM)
- Se presentó una resistencia conjunta ante CoCl_2 2mM y CuSO_4 en 6 de los aislados ensayados.
- El 100% de las donantes fueron capaces de transferir los genes que codifican para la resistencia a Co y Cu de conjugación bacteriana.
- La mayor frecuencia de transferencia de genes de resistencia a Co, en el proceso de conjugación, fue de $8,40 \times 10^{-2}$ cel. transconjugantes/ cel. donantes. El valor de frecuencia de transferencia fue de $2,13 \times 10^{-6}$ cel. transconjugantes/ cel. donantes.
- La mayor frecuencia de transferencia de genes de resistencia a Cu, en el proceso de conjugación, fue de $6,52 \times 10^{-3}$ cel. transconjugantes/ cel. donantes. El valor de frecuencia de transferencia fue de $3,03 \times 10^{-6}$ cel. transconjugantes/ cel. donantes.
- El 100% de las donantes resistentes tanto a CoCl_2 2 mM como a CuSO_4 5 mM, fueron capaces de cotransferir los genes de resistencia a estos metales.

10.Recomendaciones

- Continuar la campaña del correcto uso de los antibióticos al momento de tratar alguna infección. Las personas medicadas deben concientizarse de seguir las indicaciones de los médicos durante la aplicación de sus tratamientos, a fin de disminuir la selección de resistencia y evitar que se propaguen genes de resistencia ante distintos antimicrobianos (antibióticos, metales pesados, etc).
- Instruir a las personas una vez que son medicadas con algún antibiótico, para evitar la automedicación y extensión de los tratamientos para combatir una infección, y de esta manera asegurar que el tratamiento será eficaz y adecuado.
- Continuar con la campaña de concientización de consumo de agua limpia.
- Buscar alternativas en el uso de insecticidas, o químicos que contengan metales pesados, en los campos agricultores para evitar que los alimentos tengan exceso de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso G., Gunton J. E., Gilmour M. W., Taylor D. E. 2005. Subcellular localization and functional domains of coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology* 151: 3549-3561.

Alonso G., Ramos Y. & Guariglia V. 2008. Estudios de los determinantes de resistencia y de las propiedades conjugativas de los plásmidos presentes en aislados bacterianos venezolanos. *Mem.Inst.Biol.Exp.*5:101-104.

Angiolillo G. 2007. Caracterización de los plásmidos presentes en cepas de *Escherichia coli* uropatógenicas con resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Brock, Madigan M. T, Martinko J. M., Parker J. 2002. *Biología de los Microorganismos*. Décima Edición. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. D.F., México.

Brown S., Martin M., Deshpande S., Seal S., Huang K., Alm E., Yang Y. y col. 2006. Cellular Response of *Shewanella oneidensis* to strontium stress. *Appl.Environ.Microbiol.* 72(1): 890-900.

Bruzual I. 2002. Análisis de determinantes de resistencia a metales tóxicos presentes en plásmidos del IncHI3 e IncII. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Chávez B. E., García V. M., Avelino F. F., Gil J. C., Castañeda R. E. 2007. Identificación de tres factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos. *Enf.Inf.Microbiol.* 27 (4): 114-117.

Cervantes C., Espino-Saldaña A. E., Acevedo-Aguilar F., León-Rodríguez I.L., Rivera-Cano M.E., Avila-Rodríguez M, Wróbel-Kaczmarczyk K, y col. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev.Latinoam.Microbiol.* 48(2): 203-210.

Coello N., Guevara L., Rojas V. *Microbiología General: Guía de trabajos prácticos* 2003. Unidad Docente de Genética (Universidad Central de Venezuela). Caracas, Venezuela.

De la Iglesia A. I., Morbidoni H. R. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev.Argent.Microbiol.* 38:2.

Foerster H., Foster J. W. 1966. Endotrophic calcium, strontium and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J.Bacteriol.* 91(3): 1333-1345.

Gadd G. M. 2010 *Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation*. *Microbiology.* 156:609-643.

Glass J. B., Wolfe-Simon F., Elser J. J., Anbar A. D. 2010. Molybdenum-nitrogen co-limitation in freshwater and coastal heterocystous cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* 55(2): 667-676.

Gómez G. Joaquín. 2007. Infección urinaria por *Escherichia coli* multirresistente: impacto clínico y nuevas perspectivas. Universidad de Murcia. Murcia, España.

- Griffiths A.J.F., Miller, J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C. y Gelbart W.M. 2002. Genética. Séptima edición. Editorial Interamericana-McGraw Hill. Madrid, España.
- Harnett N. M., Gyles C. L. 1984. Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Appl.Environ.Microbiol.* 48(5): 930-935
- Ishibashi Y., Cervantes C., Silver S. 1990. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl.Environ.Microbiol.* 56:2268-2270.
- Klug W. S., Cumming M. R., Spencer C. A. 2006. Concepts of Genetics. Octava edición. Editorial Person Prentice Hall. New Jersey, Estados Unidos.
- Koneman E. W., Allen S. D., Dowel V. R., Sommers H. M. 1983. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Llosa M., Roy C., Dehio C. 2009. Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol.Biol.* 73(2): 141-151.
- Lloyd R. J. 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. The University of Manchester. Manchester, Reino Unido.
- Lovley D., Coates J. 1997. Bioremediation of metal contamination. *Current.Opn.In.Biotech.* 8:285-289.
- Marrero-Coto J., Díaz-Valdivia A., Coto-Pérez O. 2009. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Rev.Cenic.Ciens.Bio.* 41(1):67-78
- Martínez A., Cruz M., Veranes O., Carballo M. E., Salgado I., Olivares S., Lima L. 2010. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del ría Almendares. *Rev.CENIC.* 41:1-10.
- Mendoza-Hernández J., Perea V. Y., Pretelin V.C., Silveti L. A., Martínez G. M., Pérez O. G., Espinosa A. B., y Arriola M. J. 2010. Biosorción de Cromo, Arsénico y Plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Rev.Latinoam.Amb.Ciens* 1(2): 67-73.
- Navarro-Arviñó J. P., Aguilar A. I., López-Moya J. R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Rev.Ecosistemas* 16 (2): 10-25.
- Pages D., Rose J., Conrod S., Cuine S., Carrier P., Heulin T., Achouak W. 2008. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS.ONE.* 3(2):e1539.
- Paniagua C.G., Monroy P. E., Vaca P. S., González A. S. 2003. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. *Rev.Med.Hospt.Gener.Mex* 66(1):13-21.

Quesada G. C. 2010. Infecciones en humanos por bacterias anaerobias del género *Bacteroides*: actualización en aspectos taxonómicos, bioquímicos, inmunológicos, patogénicos y clínicos. *Rev.Biomed* 21:89-96.

Quesada G. C., Rodríguez C. E., Gamboa C. M. 2007. Bacterias anaerobias aisladas en muestras clínicas de pacientes de un hospital regional de adultos de Costa Rica. *Rev.Biomed* 18:89-95.

Rivera T. A., Chávez B. E., Rendón A. G., Giono C. S. 2006 Viabilidad de *Escherichia coli* en presencia de diferentes contaminantes. *Rev.Peru.Med.Exp.* 23(2):110-113.

Sáenz Y., Briñas L., Domínguez E., Ruíz J., Zarazaga M., Vila J., Torres C. 2004. Mechanisms of resistance in multiple – antibiotic= resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrob.Agents.Chemother.* 48(10): 3996-4001.

Silver S., Phung L. T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu.Rev.Microbiol.* 50: 753–789.

Timmis K. N., Pieper D. H. 1999. Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 17(5):200-4.

Timoney J.F., Port J., Giles J., Spanier J. 1978. Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. *Appl.Environ.Microbiol.* 36(3):465-472.

Top E., Mergeay M., Springael D., Verstraete W. Gene escape model: Transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Appl.Environ.Microbiol.* 56(8): 2471-2479.

Villarreal E., Navarro P., Ramos R., Andrade E., Bolívar A. y Marcano J. 2002. *Escherichia coli* identificadas en pacientes con infecciones urinarias: Sensibilidad antimicrobiana. *Rev.Soc.Ven.Microbiol.* 22(1): 18-21.

Whiteley G.C., Lee J. D. 2005 Enzyme technology and biological remediation. *Enz.Micro.Tech.* 38: 291-316.

Consultas [en línea]:

Alché L. E., García V. Bacteriófagos. 2010. Microbiología e Inmunología. Universidad de Buenos Aires. Argentina. Disponible [en línea]: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagos.htm> (Consultado: 05/02/2012)

Bastardo Y., Pedrique M. 2001. Producción de energía en los microorganismos. Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Disponible [en línea]: <http://microbiologiabasica.files.wordpress.com/2008/04/clasificacion-bacteriana.pdf> (Consultado: 09/01/2012).

Bracho M., Querales L., Caraballo L., Botero L. 2005a. Ocurrencia de resistencia a metales pesados en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de agua recreacional. Disponible [en línea]:

<http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeVeinticinco/JornadaMicrobiologia/ArchivosHTML/MB-007.pdf> (Consultado: 24/04/2012).

Bracho M., Querales L., Caraballo L., Botero L. 2005b. Resistencia a metales pesados de *Escherichia coli* en agua potable. Disponible [en línea]: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeVeinticinco/JornadaMicrobiologia/ArchivosHTML/MB-010.pdf> (Consultado: 24/04/2010)

Colombini A. 2011. Infecciones Urinarias. Comité en Control de Infecciones. Buenos Aires, Argentina. Disponible [en línea]: http://www.urologiaonline.com.ar/infecciones_urinarias.php (Consultado: 19/04/2012).

Cortés X., Fernández L. 2009. Aislamiento de Microorganismos Acumuladores de Metales. Disponible [en línea]: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_IV/CIV-40.pdf (Consultado: 09/05/2012)

Díaz J. A. Q., López S. S. 2011. Bioseguridad: Transformación Bacteriana. México. Disponible [en línea]: <http://seguridadbiologica.blogspot.com/2011/02/transformacion-bacteriana.html> (Consultado: 04/02/2012).

Gutiérrez S. 2001. Guía práctica del Laboratorio de Microbiología: Esterilización por calor húmedo (Trabajo práctico 8). Disponible [en línea]: <http://es.scribd.com/doc/6834653/esterilizacion-autoclave> (Consultado: 04/02/2012).

López G. A. 2010-2011. Genética Bacteriana. Disponible [en línea] en: <http://microral.wikispaces.com/3.+Gen%C3%A9tica+bacteriana>. (Consultado: 03/04/2012).

Pareja E. I. 1998. Conjugación bacteriana. Disponible [en línea] en: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/27_micro.htm (Consultado: 05/01/2012).

Sánchez A., Guerrero R. 1982. Genética Molecular Bacteriana. Editorial Reverté. Barcelona. España. Disponible [en línea]: <http://books.google.co.ve/books?id=CPYe5mzw-igC&pg=PA99&lpg=PA99&dq=conjugacion+bacteriana&source=bl&ots=iksv15cpJc&sig=4evc1CKZSsNREf6-XI7z7bEznSg&hl=es&sa=X&ei=3gEuT6LiGoq00QG-pOXYCg&sqi=2&ved=0CF0Q6AEwCw#v=onepage&q=conjugacion%20bacteriana&f=false> (Consultado: 04/02/2012).

Taborda, N., Florez V., Giraldo D. La Microbiología. Disponible [en línea] en: <http://www.solociencia.com/biologia/microbiologia.htm> (Consultado: 09/01/2012).

Val D. Los Medios de Cultivo en Microbiología. Disponible [en línea] en: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioMedios.htm> (Consultado: 10/01/2012).

Vullo L. D. 2003. Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. Rev. Quim. Viv. 2(3). Disponible [en línea]: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm> (Consultado: 20/04/2012)

Consultas [en línea] sin autor:

<http://www.packagingnews.co.uk/news/e-coli-cannot-survive-in-corrugated-packaging-say-eu-manufacturers/> (Consultado: 9/05/2012).

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/ba.htm#ixzz1vLd1GJnYY> (Consultado: 12/05/2012).

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/co.htm#ixzz1vLqJnT9O> (Consultado: 12/05/2012).

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cu.htm#ixzz1vLqU6A6R> (Consultado: 12/05/2012).

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/sr.htm#ixzz1vLrNvBNN> (Consultado: 12/05/2012).

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/mo.htm#ixzz1vLTLkbId> (Consultado: 12/05/2012).

<http://www.ecologiaverde.com> (Consultado: 12/05/2012)

http://danival.org/600%20microbio/6200microclin/microclin_100_infeccion.html (Consultado: 17/05/2012).

<http://www.duiops.net/seresvivos/bacterias.html> (Consultado: 13/11/2012).

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6978/02INTRODUCCION.pdf?sequence=2>
(Consultado: 13/02/2013).