



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA**

***Facultad de Ciencias*
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO DEL FENOTIPO Y LA TRASMISIBILIDAD DE LA
RESISTENCIA A VANADIO, EN BACTERIAS
CAUSANTES DE INFECCIONES EN EL TRACTO
URINARIO.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller DOUGLAS SAMUEL ZAPATA LANDAEZ como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Profa. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela

ABRIL - 2015

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE GRAFICOS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Bacterias y su metabolismo.....	1
1.2 Enterobacteriaceae.....	1
1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	2
1.3 Infecciones en humanos.....	3
1.3.1 Infecciones del Tracto Urinario.....	3
1.4 Resistencia bacteriana.....	5
1.4.1 Fases de crecimiento.....	5
1.4.2 Fase exponencial en <i>Escherichia coli</i>	6
1.4.3 Fase estacionaria en <i>Escherichia coli</i>	7
1.5 Intercambio de información genética en bacterias.....	8
1.5.1 Transformación.....	9
1.5.2 Transducción.....	10
1.5.3 Conjugación.....	10
1.6. Metales Pesados.....	12
1.6.1 Vanadio.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1. Estudios a nivel internacional.....	16
2.2 Estudios a nivel nacional.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	21

4. OBJETIVOS.....	22
5. PLAN DE TRABAJO.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1 Cepas.....	24
6.2 Medios.....	25
6.3 Suplementos de los medios: Antibióticos y metales.....	25
6.4 Determinación del fenotipo de resistencia.....	26
6.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	26
6.6 Conjugación. Determinación de los fenotipos de las transconjugantes.....	26
6.6.1 Cálculo de la Frecuencia de transferencia y título.....	27
6.7 Determinación de la resistencia a vanadio. Crecimiento en forma libre de los aislados.....	27
6.7.1 Resistencia a V en fase logarítmica.....	28
6.7.2 Resistencia a V en fase estacionaria.....	28
6.7.3 Determinación de parámetros microbiológicos.....	29
6.8 Aislamiento de plásmidos movilizados.....	29
6.9 Electroforesis en geles de agarosa.....	30
7. RESULTADOS.....	32
7.1 Determinación de la resistencia a distintos antimicrobianos. Identificación Microbiológica.....	32
7.2 Determinación del Fenotipo a la sal de Vanadio.....	37
7.3 Determinación de la resistencia a la sal de Vanadio en las distintas fases de crecimiento bacteriano.....	39

7.4 Proceso de conjugación bacteriana. Determinación de la frecuencia de transferencia.....	59
7.4.1 Vanadato de sodio.....	59
7.5 Aislamiento del DNA plasmídico.....	61
7.6 Expresión fenotípica de células donantes y transconjugantes.....	64
8. DISCUSIÓN.....	66
9. CONCLUSIONES.....	86
10. BIBLIOGRAFÍA.....	87

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla I: Cepas de <i>E. coli</i> a evaluar y fenotipo de resistencia a antibióticos.....	24
Tabla II: Antibióticos a utilizar.....	25
Tabla III. Porcentajes de resistencia de los 50 aislados de pacientes ambulatorios con ITU.....	32
Tabla IV. Resumen de los resultados de las pruebas fenotípicas de los 50 aislados.....	33
Tabla V. Resumen de los resultados de las pruebas bioquímicas de los aislados estudiados.	35
Tabla VI. Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	36
Tabla VII. Resultados obtenidos en los ensayos a los 12 aislados, con distintas concentraciones de vanadato de sodio.....	37
Tabla VIII. Unidades de D.O. en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, creciendo en ausencia de la sal del metal (NaVO ₃).....	39
Tabla IX. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en ausencia de la sal del metal (NaVO ₃).....	41
Tabla X. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en presencia de [50 mM de la sal de vanadio (NaVO ₃)].....	43
Tabla XI. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en presencia de [100 mM de la sal de vanadio (NaVO ₃)].....	45
Tabla XII. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en presencia de [200 mM de la sal de vanadio (NaVO ₃)].....	47
Tabla XIII. Fracción de supervivencia del tratamiento a [50 Mm de la sal de vanadio(NaVO ₃)].....	49
Tabla XIV. Fracción de supervivencia del tratamiento a [100 Mm de la sal de vanadio (NaVO ₃)].....	51

Tabla XV. Fracción de supervivencia del tratamiento a [200] Mm de la sal de vanadio (NaVO ₃).....	52
Tabla XVI. Logaritmo en base 10 de las U.C.F. control.....	54
Tabla XVII. Logaritmo en base 10 (LOG 10) de las U.C.F. y el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), en presencia de [50 mM de la sal de vanadio (NaVO ₃)].....	55
Tabla XVIII. Logaritmo en base 10 (LOG 10) de las U.C.F. y el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), en presencia de [100 mM de la sal de vanadio (NaVO ₃)].....	56
Tabla XIX. Logaritmo en base 10 (LOG 10) de las U.C.F. y el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), en presencia de [200 mM de la sal de vanadio (NaVO ₃)].....	58
Tabla XX. Resultados de las conjugaciones realizadas con el marcador de vanadato de sodio (NaVO ₃) 50 Mm.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Bacteria Gram negativa <i>Escherihia coli</i>	3
2. Colonización ascendente del tracto urinario por <i>Escherichia coli</i>	4
3. Curva de crecimiento en bacterias	6
4. Esquema de procesos de transferencia de material genético.....	9
5. Conjugación bacteriana.....	11
6. Ejemplos de placas con medio LB suplementadas con la sal de vanadio.....	27
7. Resultados de las pruebas fenotípicas realizadas para los 50 aislados, de la concentración más alta ensayada para cada sal.....	34
8. Resultados obtenidos en los ensayos de fenotipo de los 12 aislados y los controles positivo y negativo, a diversas concentraciones de vanadato de sodio.....	38
9.Registro Fotográfico del aislamiento plasmídico de las cepas Donantes (Método: TENS)..	62
10. Registro Fotográfico del aislamiento plasmídico de las cepas Donantes (Método: Lisis Alcalina).....	62
11. Registro Fotográfico del aislamiento plasmídico de las cepas transconjugantes.(Método: TENS)..	63
12.Registro fotográfico en las distintas horas para las fases de crecimiento para el asilado 4259.....	64
13. Registro fotográfico en las distintas concentraciones ensayadas de NaVO3 para T4259.....	65

INDICE DE GRAFICOS.

Grafico 1. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiado, en medio sin la sal del metal.....	40
Grafico 2. Crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiado....	42
Grafico 3. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiados, en un medio en presencia de [50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)]......	44
Grafico 4. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiados, en un medio en presencia de [100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)].....	46
Grafico 5. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiados, en un medio en presencia de [200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)].....	48
Grafico 6. Fracción de supervivencia de los aislados estudiados, en las distintas fases de crecimiento, en presencia de [50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)]......	50
Grafico 7. Fracción de supervivencia de los aislados estudiados, en las distintas fases de crecimiento, en presencia de [100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)]......	51
Grafico 8. Fracción de supervivencia de los aislados estudiados, en las distintas fases de crecimiento, en presencia de [200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)]......	53
Grafico 9. Logaritmo de reducción de la viabilidad de los aislados de estudios, en las distintas fases de crecimiento en presencia de [50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)]......	55
Grafico 10. Logaritmo de reducción de la viabilidad de los aislados de estudios, en las distintas fases de crecimiento en presencia de [100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)]......	57
Grafico 11. Logaritmo de reducción de la viabilidad de los aislados de estudios, en las distintas fases de crecimiento en presencia de [200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)]......	58

ABREVIATURAS

Absorbancia	ABS
Ácido Desoxirribonucleico	DNA
Ampicilina	AMP
Centro Médico Docente La trinidad	CMDLT
Concentración Mínima Inhibitoria	CMI
Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos	CVCM
Densidad Óptica	D.O.
Dodecil Sulfato de Sodio	SDS
Hidróxido de Sodio	NaOH
Infecciones en el Tracto Urinario	ITU
Microlitros	μL
Microgramo	μg
Milimolar	mM
Molaridad	M
Pentaoxido de Vanadio	V₂O₅
Resistente	R
Rifampicina	RIF
Sensible	S
Unidades Klett	UK
Unidad Formadora de Colonia	UFC
Vanadato de Sodio	NaVO₃
Vanadio	V

RESUMEN

El estudio de las interacciones de los microorganismos y los metales pesados puede ser útil para el entendimiento de las relaciones de los metales tóxicos con organismos superiores. Los microorganismos que portan algún sistema genético que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales pesados, tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de estos elementos, implicando la presencia de mecanismos que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento de ambientes contaminados con esos metales.

El objetivo planteado en este trabajo es determinar el fenotipo de resistencia a Vanadio 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, mediante ensayos de conjugación, aislamiento de los plásmidos movilizados y comprobar si existen o no diferencia en la expresión fenotípica entre las bacterias donantes y las bacterias transconjugantes.

Para cumplir estos objetivos se realizó el crecimiento de los aislados en medios suplementados con antibióticos marcadores, y con el metal de estudio determinando la concentración mínima inhibitoria. La transmisibilidad de la capacidad de resistencia se determinará por el proceso de conjugación, purificando posteriormente los plásmidos movilizados para su análisis mediante electroforesis en geles de agarosa.

Los resultados obtenidos demostraron que, todos los aislados pudieron crecer frente las concentraciones de la sal de vanadio estudiada (50, 100 y 200 mM). Los 12 aislados presentaron fenotipo de resistencia para 200 mM de NaVO_3 la mayor concentración ensayada, y transfirieron mediante el proceso de conjugación dichos genes, obteniendo 11 (91,6%) cepas transconjugantes, que presentaron el mismo fenotipo de resistencia frente a 200 mM de NaVO_3 . Los valores obtenidos para la frecuencia de transferencia por conjugación de los genes que confieren resistencia a V oscilaron entre $8,46 \times 10^{-4}$ y 1×10^{-3} células transconjugantes/células donantes, Estos valores entran en el rango de plásmidos de frecuencia de transferencia relativamente alta. Quedo demostrado la capacidad de crecer frente altas concentraciones de la sal de metal pesado en las distintas fases de crecimiento, los resultados demuestran un mayor crecimiento en fase estacionaria a bajas concentraciones, mientras un mejor crecimiento encontrado frente a altas concentraciones en la fase exponencial de crecimiento. También se obtuvo para el aislamiento de ADN plasmídico, moléculas de gran tamaño por encima de los 20 Kb.

Todos estos resultados en conjunto sugieren que estas cepas poseen plásmidos portadores de multideterminantes de resistencia, convirtiéndose así en cepas multirresistentes ante una gran cantidad de antimicrobianos, tales como antibióticos y metales tóxicos. Es de gran importancia estudiar grupos bacterianos con diferentes mecanismos entre ellos los que involucran conjugación, dado a que varios sistemas microbianos de resistencia a metales pesados tienen el potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos.

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).

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 de energía pueden ser orgánicas e inorgánicas. Las orgánicas incluyen gran número de compuestos que van desde 2 átomos de carbono hasta moléculas más complejas tales como el almidón. Las fuentes inorgánicas incluyen el dióxido de carbono, el sulfuro de hidrógeno y otras moléculas (Bastardo y Pedrique, 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 estos 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 Enterobacteriaceae.

Las enterobacterias comprenden un grupo relativamente homogéneo de bacterias que se caracterizan por ser anaerobias facultativas, Gram negativas, no esporulados, inmóviles o

móviles por flagelación peritrica, aerobias o anaerobias facultativos, oxidasa negativas, con requerimientos nutritivos muy sencillos (Brock y col., 2002).

Los bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae, como el nombre lo 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 infecciones en diferentes lugares (Koneman y col., 1983).

Debido a la importancia médica de las enterobacterias, se han aislado y estudiado un gran número de ellas. Dado que estos microorganismos pueden ser cultivados a partir de aislamientos clínicos, se requieren algunos métodos de identificación que faciliten el tratamiento de la infección rápidamente (Brock y col., 2002).

1.2.1 *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo, de la familia Enterobacteriaceae. (Figura 1). Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de la flora habitual. Sin embargo, hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Rodríguez, 2002).

Escherichia coli es la enterobacteria que más se ha estudiado y por lo tanto una, de la cual más se conoce.

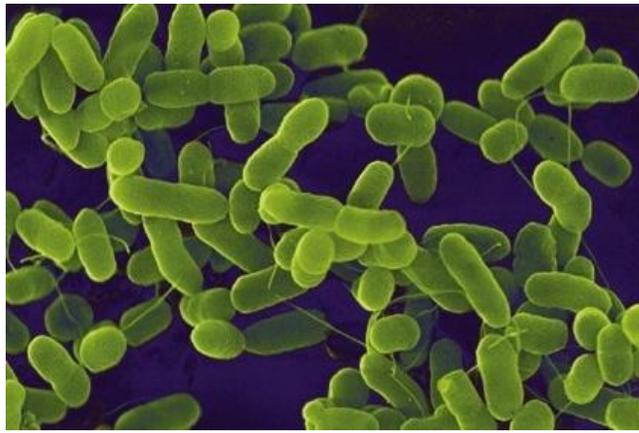


Figura 1.- Bacteria Gram negativa *Escherichia coli* (Tomado de: <http://salud.com.es/la-bacteria-e-coli.html>).

1.3 Infecciones en humanos.

Una infección se define como la implementación y el desarrollo de patógenos en un organismo (hospedador).

La naturaleza de una infección puede variar ampliamente en relación con la gravedad, la localización, y el número de microorganismos que participan en los procesos. Una enfermedad causada por un agente infeccioso es cualquier desviación de la salud, por la que parte o la totalidad del hospedero no está en equilibrio y es incapaz de realizar sus funciones normales, debido a la presencia del organismo infectante o sus productos (Brock y col., 2002).

1.3.1 Infecciones del Tracto Urinario.

Las ITU (Infecciones del Tracto Urinario) son un proceso inflamatorio determinado por la invasión y multiplicación de cualquier microorganismo, en la región comprendida desde la uretra hasta el riñón. Representan un problema de salud frecuente, cuya incidencia varía según la edad y el sexo (Cires y col., 2002).

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 infecciones provienen del intestino grueso y entran a la vejiga, luego de haberse instalado inicialmente en uretra, colonizan tanto la zona uretral como la periuretral (Colombini, 2011).

Las infecciones urinarias están causadas por un escaso número de especies bacterianas algunas son: Estreptococos, *Pseudomonas aeruginosa*, y Enterobacterias (Koneman y col., 1983). Pero más del 95 % de ellas son producidas por una sola especie: *Escherichia coli*. La mayoría de los episodios están producidos por microorganismos aerobios Gram negativos provenientes del colon, por lo general son las Enterobacteriaceae de la flora fecal que coloniza la zona urogenital (Figura 2). La minoría de los episodios posee una etiología exógena, es decir, son producidos por microorganismos ambientales, con frecuencia introducidos en las vías urinarias durante su manipulación (Grau, 2002).

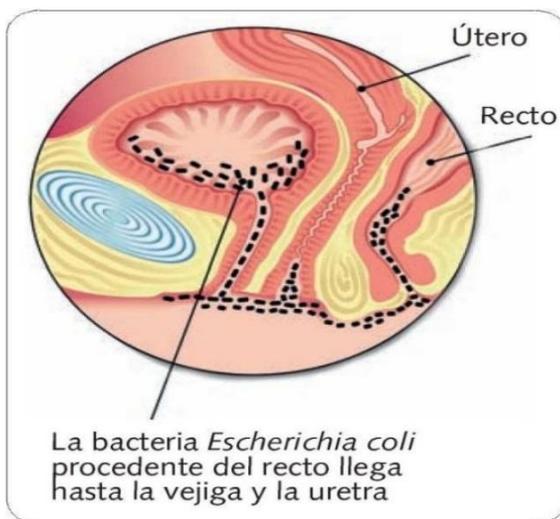


Figura 2.- Colonización ascendente del tracto urinario por *Escherichia coli*. (Tomado de: <http://vidabidet.com/padecimientos/infecciones-urinarias-html%E2%80%8E/>, 2014).

1.4 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se define como una condición microbiológica caracterizada por la capacidad de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericida o bacteriostáticos de un antibiótico (Guzmán, 2006).

La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural de una especie o género es una característica del conjunto de cepas o de todo un género, con independencia de las condiciones de aislamiento, y es transmisible a su descendencia (trasmisión vertical) por su naturaleza cromosómica. Esta resistencia natural determina los fenotipos silvestres de las especies bacterianas frente a los antimicrobianos (Jehl y col., 2004)

La resistencia adquirida concierne sólo a una porción, variable en el tiempo, de aislados de una misma especie o de un género. Se produce gracias a la adquisición de uno (o varios) mecanismo(s) de resistencia que determina(n) un fenotipo diferente del fenotipo silvestre. Esta resistencia se adquiere por mutaciones o por la ganancia de determinantes genéticos que pueden formar parte de un elemento móvil (plásmido, o transposón), que se transmite horizontalmente, a veces incluso entre especies diferentes (Jehl y col., 2004).

Los microorganismos que poseen alguno de estos sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales pesados, tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con concentraciones de estos elementos que son inhibidores para otros microorganismos (Marrero-Coto y col., 2010).

1.4.1 Fases de crecimiento.

Las bacterias enfrentan constantemente condiciones que limitan o impiden su crecimiento. Su habilidad para colonizar un ambiente requiere de la capacidad para alternar periodos de rápida división celular y períodos de crecimiento nulo. Las características de las

células en estos periodos pueden analizarse en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura, oxigenación y composición del medio de cultivo (Ramírez y col., 2005).

La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases: 1) fase de transición o de latencia, 2) fase logarítmica o exponencial (FE), 3) fase estacionaria (FS) y 4) fase de muerte, (figura 3). La fase de latencia representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un cambio en el medio de crecimiento.

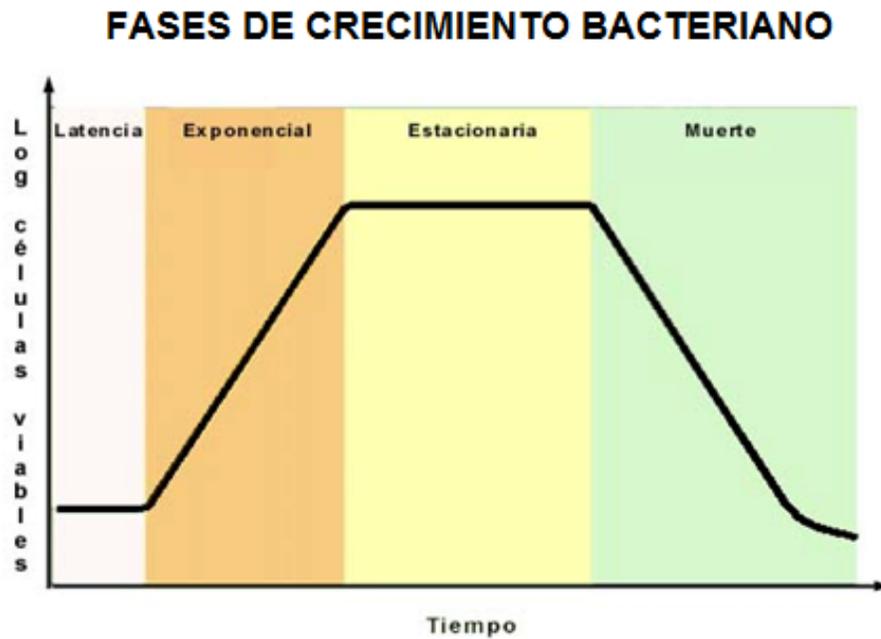


Figura 3.- Curva de crecimiento en bacterias. (Tomado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>)

1.4.2 Fase exponencial en *Escherichia coli*.

Es un periodo de crecimiento o de incremento logarítmico, la reproducción celular alcanza una actividad máxima durante este período y su tiempo de generación llega a un mínimo constante. Es una consecuencia del hecho que cada célula se divide para formar dos células, cada una de las cuales también se divide para formar dos células más y así

sucesivamente. Durante esta fase los microorganismos consumen los nutrientes a velocidad máxima.

Una sola bacteria, por ejemplo de *E. coli* a 37 °C, en condiciones adecuadas se puede dividir una vez cada 20 minutos. Repitiendo este proceso durante 11 horas se obtiene una colonia con casi diez mil millones de individuos. Si hubiera nutrientes suficientes en dos días, la masa de esta colonia excedería la masa de la Tierra. Obviamente, no los hay (Hagen., 2010).

Las células descendientes de la primera pueden no ser clones idénticas de ésta, sino que presentan una gran diversidad de mutaciones; la mayoría son clones pero el porcentaje de mutantes puede ser muy alto. La razón de estas mutaciones está en la tasa de error en la duplicación del ADN que realiza la ADN polimerasa, que en *E. coli* es del orden de un nucleótido por cada millón de bases duplicadas. Después de treinta generaciones podemos esperar que cerca del 25% de las células descendientes presenten una mutación (unas 250 millones de células) (Hagen.; 2010).

1.4.3 Fase estacionaria en *Escherichia coli*.

En cultivos bacterianos cerrados una población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones del crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcanza un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de causas anteriores. Este periodo en el cual cesa el crecimiento se conoce como fase estacionaria.

En la fase estacionaria (FS) ocurren cambios dramáticos en la estructura y fisiología de los microorganismos. En esta fase disminuye el volumen celular y las bacterias se redondean, disminuye la tasa global de síntesis de DNA, RNA y proteínas, aumenta la degradación de proteínas, se reorganiza el metabolismo general y se acumulan compuestos

de reserva (polifosfato y glucógeno) y osmoprotección (trehalosa y glicina betaina) (Ramírez y col., 2005).

Los cambios en el metabolismo general, el aumento de compuestos de reserva y de osmoprotección, la remodelación de la envoltura celular y la expresión diferencial de genes contribuyen a que las células en fase estacionaria mantengan la viabilidad y muestren mayor resistencia a diversos factores de estrés, por ejemplo: radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno, calor, antibióticos y concentraciones salinas elevadas. Esto sugiere que las bacterias que no esporulan, en respuesta al ayuno presentan una diferenciación celular con algunas características similares a la esporulación.

1.5 Intercambio de información genética en bacterias.

Las bacterias al igual que todos los seres vivos, 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 tipos: fenotípicas y genotípicas. El estudio de la genética bacteriana permite un mejor entendimiento de las funciones esenciales del 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).

En los microorganismos, la información genética puede transmitirse a la descendencia mediante proceso de replicación celular y segregación celular. Pero también existe un intercambio horizontal de DNA en las poblaciones bacterianas, el cual se lleva a cabo mediante los procesos de conjugación, transformación y transducción (Walker, 2000) (figura 4).

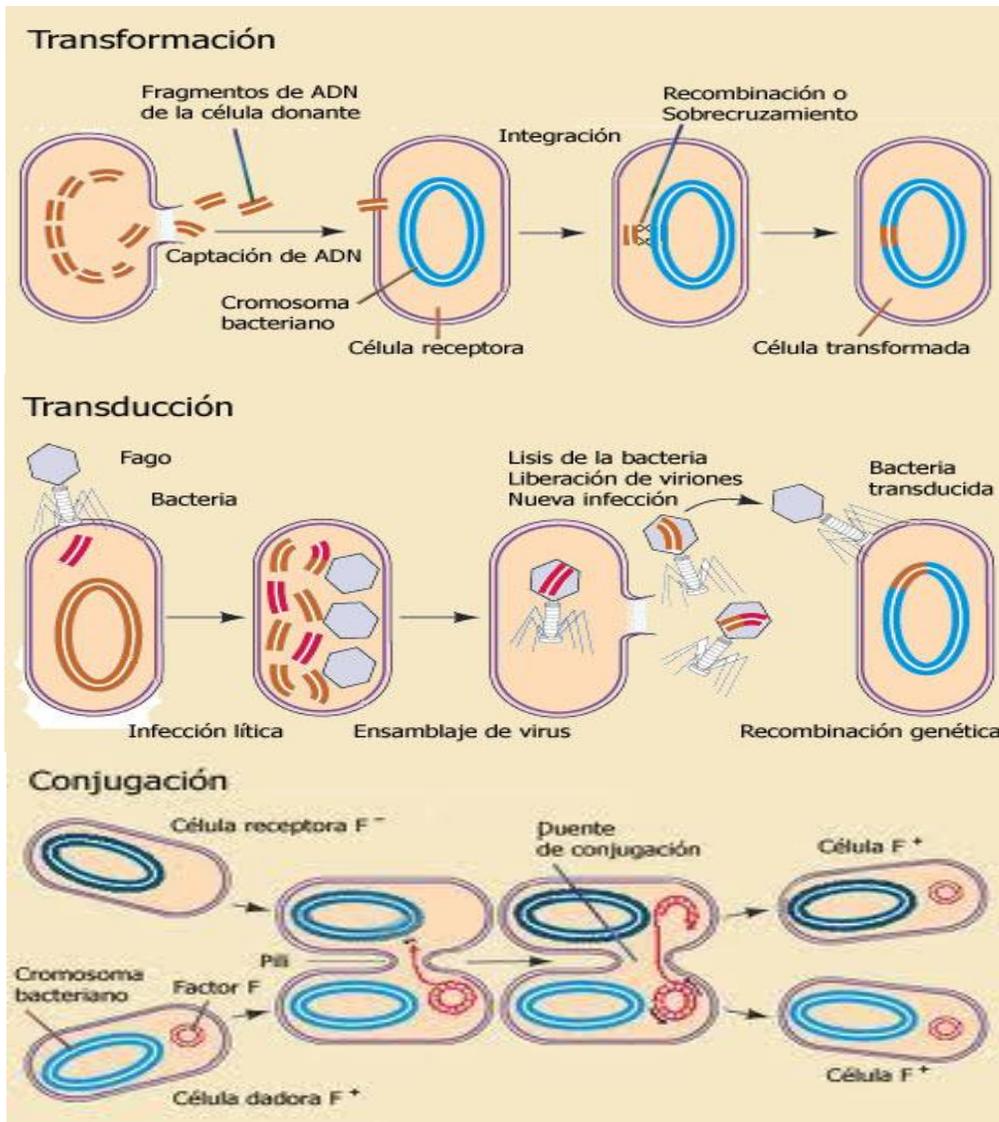


Figura 4.- Esquema de procesos de transferencia de material genético. **A.** Proceso de transformación, **B.** Transducción y **C.** Conjugación (Tomado de: http://bioanatomiaappu.blogspot.com/2013_04_01_archive.html).

1.5.1 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 y col, 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).

1.5.2 Transducción.

La transducción se puede definir como el proceso de transferencia genética desde una célula donadora a otra receptora, mediado por partículas de bacteriófagos que contienen ADN genómico de la célula donante. Inicialmente el material genético se introduce en el interior de la cápside del fago. Estos fagos que adquirieron material genético de la bacteria infectada pueden salir por lisis, de la célula “donante” e infectar otra bacteria; a la cual pueden transmitirle e integrarle el DNA que llevan, y eventualmente recombinarse con el cromosoma y expresar su información (Negroni, 2009).

1.5.3 Conjugación

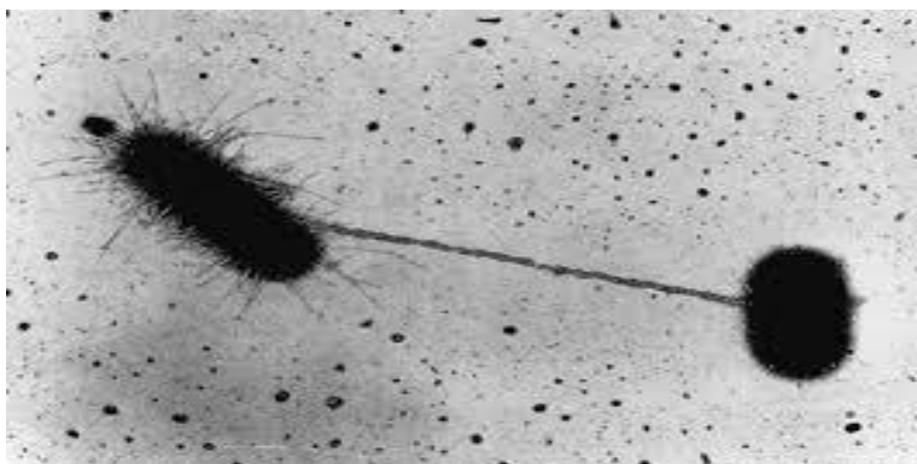
La conjugación es un proceso por el cual se transmite de manera directa el DNA plasmídico de una bacteria hacia otra, a través de un puente de conjugación (Walker, 2000).

La conjugación es uno de los mecanismos de transmisión de la información genética más importantes realizados por las bacterias, permitiendo la adquisición de genes que codifican para la resistencia a diversos agentes antimicrobianos, incluidos los metales pesados. 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 multirresistentes (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 diversos agentes, 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 la célula donante hasta la receptora (figura 5), 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).



Figuras 5.- Conjugación bacteriana. Se muestra a una célula donante (a la izquierda) con una célula receptora (a la derecha) en contactos mediante el puente de conjugación (Tomado de: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/biomonera3.php>).

Además de los plásmidos se han reportado otras moléculas asociadas al movimiento de genes bacterianos, tales como los integrones y los transposones.

El termino integrón o elemento de integración fue propuesto por Stokes y Hall en 1989, aunque la actual definición fue introducida en 1995 por Hall y Collis. Los integrones

son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia (González y col, 2004). Por su parte, los transposones son segmentos de ADN con la capacidad de moverse en el genoma (Ivics y col, 2009).

1.6. Metales Pesados.

Los metales se cuentan entre los materiales más útiles que se conocen. De los 106 elementos descritos, 84 se clasifican como metales, por lo tanto, las posibilidades de contaminación por metales es numerosa (Reyes y Suárez, 2002).

Los metales conforman alrededor del 75% de los elementos conocidos; ellos se encuentran en toda la biosfera, siendo elementos importantes tanto para los ciclos de vida de los seres vivos como para las industrias (Gadd, 2010). Las actividades de los humanos, tales como minería, industrias, extracción petrolera, de gas etc., han provocado un incremento en los niveles de metales 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).

No todos los metales representan riesgos para el ambiente o la flora, fauna o el hombre; algunos no son tóxicos mientras que otros, aun cuando lo sean, son muy escasos como contaminantes o sus compuestos son insolubles. Como resultado, sólo algunos de ellos (Hg, Cd, Pb, entre otros) se consideran en la actualidad como contaminantes ambientales (Stocker y Seager, 1981; Nies, 1999).

Existen 13 metales y metaloides que son considerados contaminantes principales: Plata, Arsénico, Berilio, Cadmio, Cromo, Cobre, Mercurio, Níquel, Plomo, Estroncio, Selenio, Titanio, y Zinc. La contaminación se origina 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).

El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Específicamente, las bacterias han sido objeto de numerosos estudios por su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos esenciales para la vida (C, N, P y S), así como por su capacidad para transformar compuestos no esenciales, que eventualmente pueden representar una amenaza para el ambiente (Gadd, 2010).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar efectos nocivos de los metales tóxicos. Entre ellas se encuentran principalmente los que involucran:

i) Componentes celulares que capturan a los iones intra o extracelularmente, neutralizando su toxicidad; ii) enzimas que realizan transformaciones de óxido-reducción que generan especies químicas menos tóxicas y, iii) sistemas de expulsión de la membrana que mantienen en niveles bajos las concentraciones citoplasmáticas de los iones nocivos (Cervantes, 2000; Cervantes y col., 2006).

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 presencia 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 especies tóxicas (Vullo, 2003). Algunos mecanismos bacterianos de resistencia a metales pesados como el mercurio, cadmio, cromo, plata, níquel, zinc arsénico y telurito han sido ampliamente estudiados (Silver y Phung, 1996).

1.6.1 Vanadio.

El Vanadio es el elemento químico de símbolo V, número atómico 23, peso atómico 50.942. Varios de los compuestos de vanadio se emplean en la industria química, sobre todo en la fabricación de catalizadores de oxidación, y en la industria cerámica como agentes colorantes.

El vanadio al igual que otros elementos de transición, tiene la capacidad de formar compuestos que con frecuencia son complejos por su valencia variable. Tiene al menos tres estados de oxidación, 2+, 3+ y 5+. Es anfótero, principalmente básico en los estados de oxidación bajos, y ácido en los altos. Forma derivados de radicales más o menos bien definidos, tales como VO^{2+} y VO^{3+} . En su forma pura es blando y dúctil. Puede trabajarse en caliente y frío fácilmente, pero debe calentarse en una atmósfera inerte o al vacío a causa de que se oxida rápido a temperaturas por encima del punto de fusión de su óxido (<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/v.htm>).

El Vanadio puede ser encontrado en el ambiente, en algas, plantas, invertebrados, peces y muchas otras especies. En mejillones y cangrejos se acumula fuertemente, el cual puede ser acumulado en concentraciones de 10^5 a 10^6 veces mayores que las concentraciones que son encontradas en el agua salada.

Se han estudiado los efectos del Vanadio sobre la salud y puede encontrarse que la mayor acumulación de Vanadio en los seres humanos tiene lugar a través de las comidas, como son, trigo, semilla de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, manzanas y huevos. El Vanadio puede tener un número de efectos sobre la salud humana, cuando la toma es muy alta. Cuando el Vanadio es acumulado a través del aire, puede causar bronquitis y neumonía. Los efectos graves del Vanadio son irritación de pulmones, garganta, ojos y cavidades nasales. Otros efectos sobre la salud cuando se toma Vanadio son: daño cardíaco y vascular, inflamación del estómago e intestinos, daño en el sistema nervioso,

sangrado del hígado y riñones, irritación de la piel, temblores severos y parálisis, sangrado de la nariz y dolor de cabeza y mareos.

El Vanadio causa la inhibición de ciertas enzimas de células animales, lo cual tiene varios efectos neurológicos. El vanadio puede causar desordenes respiratorios, parálisis y efectos negativos en el hígado y los riñones y afectar diversos órganos (<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/v.htm>).

Es muy poco lo que se ha estudiado sobre la relación entre bacterias y vanadio. En el año 2009, Marwijk y Opperman, estudiaron la reducción de vanadio por *Enterobacter cloacae* EV-SA01. Se relacionó a una enzima vanadato reductasa asociada a la membrana y junto a la oxidación de NADH, ocurría la reducción de vanadio. En la mayoría de los aislamientos se observó la reducción de vanadio en condiciones anaerobias; un cambio de color amarillo (vanadio 5+) a un negro-azul (vanadio 4+). La coloración oscura de una colonia bacteriana se consideró un marcador preliminar para la reducción del metal y la precipitación, mientras que un halo claro que rodea a las colonias fue considerado como un posible secuestro del metal (Marwijk y Opperman, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudios a nivel internacional.

Han sido muchos los estudios a nivel mundial relacionado con infecciones urinarias generadas por bacterias en cuanto a su aislamiento, identificación, causas y resistencia ante los agentes antimicrobianos tales como antibióticos, detergentes, metales pesados, etc. Igualmente, el estudio de diversos microorganismos que realizan procesos de interés potencial para la biorremediación, ha tenido gran relevancia a nivel mundial, dado a su gran importancia para la recuperación de metales valiosos en la industria, o limpieza de las aéreas contaminadas por dichos metales tóxicos. A continuación se presentan una recopilación de varios 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 aislados de *Bacillus sp.* presentes 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. Se ensayó la resistencia de estos aislado para mercurio (Hg) y ampicilina (AMP). 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 el 2003, se evaluaron los efectos de los metales pesados en células de *Pseudomonas aeruginosa* creciendo de forma libre en fase logarítmica, en fase estacionaria, y crecimiento en biopelícula. Los investigadores reportan que el crecimiento en forma libre en fase logarítmica es más resistente a los metales pesados que en fase estacionaria, reportando que podría deberse a la actividad de bombas de eflujo de metales pesados, ya que este

mecanismo requiere ATP, el cual es abundante en las células metabólicamente activas (Teitzel y Parsek, 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 ensayadas de metales pesados (Fe, Co, Mo, Pb, Ni, Cu, Hg y V) (Chávez y col., 2007).

En 2009, Marwijk y colaboradores estudiaron la reducción de vanadio (V) por *Enterobacter cloacae* EV-SA01 aislado de una profunda mina de oro sudafricana. Los autores reportan la reducción desasimilatoria de vanadio. Trabajaron con 14 aislados capaces de crecer aeróbicamente y anaeróbicamente. Las tasas de crecimiento no se vieron afectadas hasta 2 mM de V_2O_5 . La reducción de vanadio fue fase de crecimiento-dependiente dando lugar a deformidades en las células y la precipitación del vanadio en sus estados de oxidación más bajos. La actividad de una vanadato reductasa fue asociada a la membrana y esta actividad junto a la oxidación de NADH se asoció a la reducción de vanadato (Marwijk y Opperman, 2009).

En 2012, Kafilzadeh y colaboradores, estudiaron y evaluaron la resistencia a plomo de bacterias de los géneros: *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Corynebacterium* sp, *Staphylococcus* sp y *E. coli* provenientes de una estación de servicio de Irán. Determinaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) en fase logarítmica, la tasa de eliminación de plomo en cepas con alta MIC y su posible uso en biorremediación. Encontraron que las bacterias Gram positivas presentaron mayor crecimiento que el crecimiento observado para las bacterias Gram negativas; la concentración más alta ensayada fue de 0.7 gr/L a la cual *Bacillus* sp presentó mayor crecimiento, las demás crecieron hasta 0.4 gr/L. Obtuvieron que bacterias aisladas del suelo de la estación de servicio eran capaces de eliminar el plomo. El resultado obtenido por el espectrofotómetro de absorción atómica fue: *Bacillus* sp, 89,66%, *Pseudomonas* sp, 87,97%, *Corynebacterium* sp 86,64%, *Staphylococcus* sp 64,82 % y *E.*

coli con 60,35%. Demostraron que *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Corynebacterium* sp, son altamente resistentes a plomo y pueden ser utilizadas para biorremediación del plomo (Kafilzadeh y col; 2012).

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 metales pesados de bacterias aisladas de infecciones, son escasos. A continuación se presentan algunos de los trabajos más relevantes realizados en los últimos años sobre estos temas en nuestro país.

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. 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/sulfametaxazol (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 2005, acerca de la caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados bacterianos nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. 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 presentan la resistencia ante ellos. Estos 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., 2005).

Bracho y colaboradores en 2005, reportan un trabajo acerca de la resistencia de *E. coli* a metales pesados, tales como: mercurio, cromo, cadmio y níquel, en 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. Las concentraciones mínimas inhibitorias de crecimiento estaban comprendidas entre los rangos de los 200 y 1000 mg/L (Bracho y col., 2005).

En el 2007, Angiolillo reporta la caracterización de los plásmidos presentes en 50 cepas de *E. coli* uropatogénicas con resistencia a trimetoprim/sulfametaxazol, las cuales fueron caracterizadas e identificadas mediante técnicas microbiológicas. El autor concluyó que no parece existir relación entre los distintos plásmidos encontrados en las cepas causantes de ITU (Angiolillo, 2007). En 2013, Bazdikian caracteriza esos mismos 50 aislados de *E. coli*, realizando ensayos para determinar el fenotipo de resistencia a sales de Bario, Cobalto, Cobre, Estroncio y Molibdeno. Además ensayó la capacidad de estos aislados, para transferir el fenotipo de resistencia mediante conjugación. El 24% de los aislados fue resistente a Co 2 mM, el 46 % fue resistente Cu 5 mM, mientras que para Ba, Sr y Mo no pudo determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC). Todos los aislados con resistencia a Co 2 mM y Cu 5 mM fueron capaces de transferir dichos genes de resistencia. El trabajo concluyó que mediante los procesos de transferencia de material genético horizontal diversos fenotipos de resistencia pueden propagarse a otras células (Bazdikian, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN.

Tanto en ambientes contaminados, como en las infecciones del tracto urinario, *E .coli* está presente, siendo la bacteria identificada con mayor frecuencia como responsable de las ITU. Además, se ha reportado un incremento de de la presencia de bacterias con resistencia ante diversos antimicrobianos, debido, quizás, a la presión selectiva a la que son sometidas constantemente.

Debido a la presencia de múltiples resistencias, y en especial las bacterias resistentes a metales tóxicos, se convierten en organismos que potencialmente pueden ser usados en procesos de biorremediación, debido a la capacidad que presentan de sobrevivir en ambientes contaminados con estos metales pesados, sugiriendo la presencia de sistemas que pueden transformar y/o absorber estos compuestos.

Las interacciones metal-microbiota son estudiadas en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos novedosos de remoción, recuperación o destoxificación de metales pesados. Los metales tienen efecto sobre el funcionamiento de los ecosistemas y estos varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública. Un número importante de bacterias son capaces de reducir los compuestos metálicos a través de la respiración anaeróbica, entre los que se encuentran: V, Fe, Mn, As, Hg, Se, Cr, Mo, entre otros.

Muchas de las actividades humanas tienen un impacto negativo sobre varios procesos biológicos y no hay duda de que estos continuarán afectando el normal funcionamiento de ecosistemas, por lo cual es importante obtener información sobre la presencia y distribución de bacterias resistentes al V y de su adaptación, la mejor evidencia del papel biológico del V puede describirse de la investigación en bacterias. La elevada abundancia del V en fósiles de origen animal y vegetal hace surgir la duda si este metal fue

usado antiguamente por los organismos o si contribuye con su descomposición y fue adquirido durante este proceso.

En general, a nivel mundial, se han realizado estudios para determinar la presencia de genes cuyos productos están involucrados en la resistencia bacteriana a los antibióticos, pero no hay reportes nacionales sobre los genes cuyos productos protegen a las bacterias de los efectos de los metales pesados como biocidas, ni del posible uso de las enzimas de estos microorganismos para la recuperación de los ambientes contaminados.

En Venezuela no se han realizado estudios sobre este tema, ni la probable relación que pueda existir entre el crecimiento bacteriano y la capacidad de crecer en presencia de vanadio, en particular con bacterias aisladas de pacientes. Estos estudios y sus resultados pueden ser de importancia para entender las vías de diseminación y mantenimiento de los plásmidos que contienen los genes para la resistencia. En este trabajo se propone utilizar técnicas microbiológicas y genéticas para la identificación de aquellas cepas resistentes a sales de vanadio, y evaluar su capacidad de transferencia.

4. OBJETIVOS.

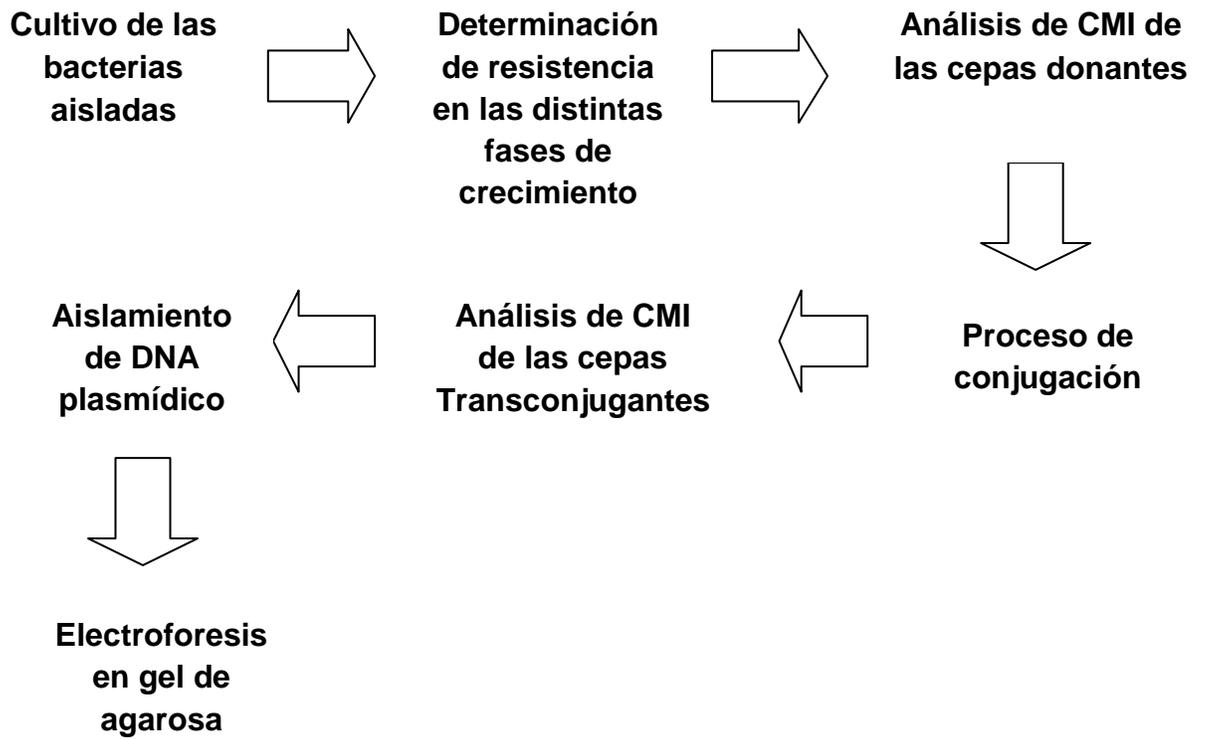
OBJETIVO GENERAL

- Determinar el fenotipo de resistencia a Vanadio 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 de resistencia a vanadio de aislados de *E. coli*.
2. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias del metal, en los aislados bacterianos que presentaron resistencia.
3. Analizar la capacidad de los aislados resistentes para transmitir la resistencia mediante ensayos de conjugación.
4. Aislar los plásmidos movilizados y analizar mediante electroforesis de geles de agarosa.
5. Comprobar si existen o no diferencias en la expresión fenotípica entre las bacterias donantes y las bacterias transconjugantes, relacionando las posibles diferencias con las fases del crecimiento bacteriano.

5. PLAN DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Cepas

Las cepas bacterianas que se estudiaron en este trabajo, se encuentran almacenadas en el Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental. Éstas, previamente identificadas como *Escherichia coli*, fueron aisladas de pacientes que acudieron a consulta externa 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 de 2006. Como control para los experimentos a realizar, se utilizó la cepa *E. coli* K12 J62-2 número 131, del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) de fenotipo F⁻, RIF^R, his⁻, pro⁻, trn⁻ (Angiolillo, 2007), se utilizó como control positivo U329, V^R, GEN^S, AMK^S, SXT^S (Chalbaud, 2010; Chalbaud, 2012). En la tabla I se nombran los controles y las cepas utilizadas para este estudio.

Tabla I: Cepas de *E. coli* a evaluar y fenotipo de resistencia a antibióticos.

Aislados	AMP	RIF
J62-2 (Control -)	S	R
U329 (Control +)	S	S
3213	R	S
3372	R	S
3742	R	S
3992	R	S
4259	R	S
4375	R	S
4388	R	S
4569	R	S
4662	R	S
4715	R	S
4729	R	S
4739	R	S

R: Resistente, **S:** Sensible, **AMP:** Ampicilina, **RIF:** Rifampicina, El número de la cepa es el número otorgado por el Laboratorio de Bacteriología del Centro Médico Docente La Trinidad.

6.2 Medios

Para el crecimiento de los aislados en medio líquido se empleó el medio rico, Luria-Bertani (LB), que contiene por litro de agua destilada 10g de triptona, 5g de extracto de levadura; 5g de cloruro de sodio. Para el crecimiento de los aislados en medio sólido se empleó agar LB que contiene por litro de agua destilada 10g de triptona, 5g de extracto de levadura; 5g de cloruro de sodio y 15g de agar (Coello y col., 2003).

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 20 min. Una vez esterilizado todo el material se trabajó bajo la llama de un mechero, en condiciones de esterilidad y asepsia

6.3 Suplementos de los medios: Antibióticos y metales

Los antibióticos utilizados se seleccionaron de acuerdo a la resistencia reportada anteriormente para cada uno de los aislados (Angiolillo, 2007; Bazdikian, 2013). Las soluciones de los antibióticos fueron almacenadas a -20 °C y agregados a los diferentes medios de cultivo de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla II.

Tabla II. Antibióticos utilizados en este trabajo.

Antibiótico	Solvente	Concentración	
		[STOCK mg·mL ⁻¹]	[USO µg·mL ⁻¹]
Ampicilina (AMP)	H ₂ O _{MILLIQ}	50	50
Rifampicina (RIF)	Metanol	30	100

STOCK, concentración de la solución concentrada de los antibióticos. USO, concentración final de los antibióticos. H₂O_{MILLIQ}, agua bidestilada y desionizada.

La solución stock de vanadio fue preparada a partir de la sal vanadio NaVO₃ a una concentración de 1M (121,9 mg·ml⁻¹) en H₂O_{MILLIQ} (agua bidestilada y desionizada). Esta

solución fue diluida en los diferentes medios de cultivo. En la figura 6 se muestran placas de Petri con medio LB suplementadas con la vanadio.

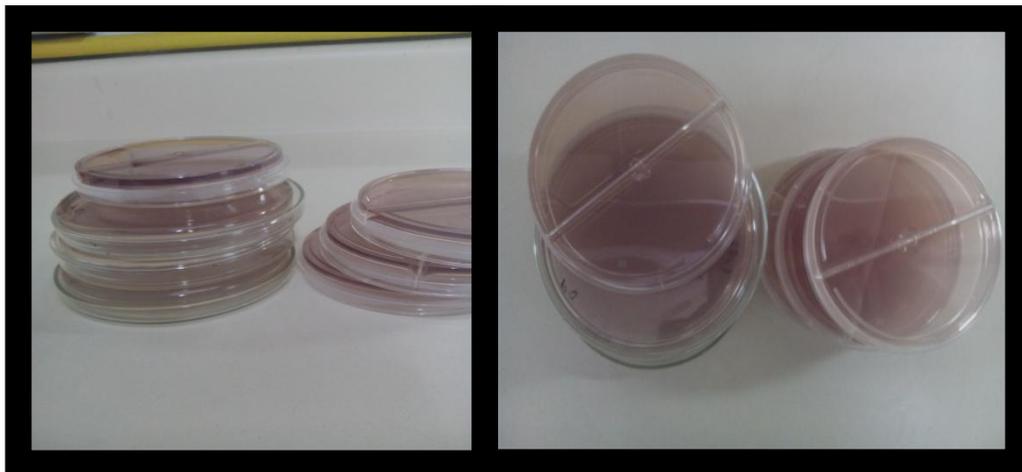


Figura 6. Registro fotográfico de Placas de Petri, con medio LB suplementadas con la sal de vanadio

6.4 Determinación del fenotipo de resistencia.

Se preparó un medio de cultivo LB, adecuado para el crecimiento de las células suplementados con NaVO_3 , a partir de una solución stock 1M. Los cultivos sembrados se crecieron en este medio suplementado, por el tiempo indicado en cada experimento.

6.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

La MIC se determinó ensayando el crecimiento de los aislados bacterianos a distintas concentraciones de la sal de vanadio, definiendo la MIC como la menor concentración de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo analizado.

6.6 Conjugación. Determinación de los fenotipos de las transconjugantes.

Se utilizaron como cepas donantes para el proceso de conjugación aquellas cepas de *E. coli* bajo estudio, provenientes del Centro Médico Docente La Trinidad, que exhibieron resistencia a V, a las distintas concentraciones ensayadas. Como cepas receptora se utilizó *E. coli* K12 J62-2, del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.

Para el ensayo de conjugación se sembró por agotamiento una alícuota de las cepas de interés (tanto donantes como receptoras) 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 para cada cepa bacteriana, y se incubaron toda la noche. Se tomaron 60 µL de cada una de las cepas y se colocaron en tubos con 3 mL de caldo LB (dilución 1/50), que fueron colocados en agitación a 37 °C hasta que la cepa donante y la cepa receptora alcanzaron 0.4 Unidades de absorbancia a 600 nm.

Se preparó la mezcla de conjugación tomando 0,1 mL de la cepa donante, y 0,4 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 (Modificación del método de Bazdikian, 2013).

Al finalizar el tiempo de incubación, se uso el método de titulación y siembra por gotas para determinar el título bacteriano. Se sembraron las transconjugantes en medio LB suplementado con RIF y la concentración de Vanadio menor de aquella a la cual el crecimiento de la cepa control fue inhibido. Todas las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

6.6.1 Cálculo de la Frecuencia de transferencia y título.

El título se calculó como lo indica la fórmula:

$$\textit{Título} = \frac{\textit{UFC x Dilución}}{\textit{Volumen de siembra}}$$

La frecuencia de conjugación se calculó mediante la fórmula:

$$\textit{Frecuencia de conjugacion} = \frac{\textit{Título transcojugante}}{\textit{Título donante}}$$

6.7 Determinación de la resistencia a vanadio. Crecimiento en forma libre de los aislados.

A partir del precultivo de cada aislado (crecido 37 °C durante 14-16 horas en agitación

constante), se realizó una dilución 1:100 en caldo LB y se incubó a 37 °C en un rotor. A esta dilución se le determinó la densidad óptica (DOx) a diferentes tiempos de crecimiento (0, 2, 4, 5, 24 y 48h) y se sembraron 5 µL de las diferentes diluciones en placas de LB para determinar las Unidades Formadoras de Colonias (UFCx) para cada tiempo, y se realizó la siembra por triplicado.

6.7.1 Resistencia a V en fase logarítmica.

La resistencia en la fase logarítmica de crecimiento fue evaluada por crecimiento en medio líquido con concentraciones de 50, 100 y 200 mM de la sal de vanadio (NaVO₃). La solución de Vanadio fue agregada a las 2 horas de crecimiento, ya para este tiempo se considera que el cultivo se encuentra en fase logarítmica. Finalizado el periodo de crecimiento en presencia del V, se realizó la siembra en placas de agar LB, utilizando el método de titulación por gotas. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h. Se tomó en cuenta la mínima concentración a la cual no se observó crecimiento después del inóculo como el valor al cual la cepa es sensible al V. La siembra se realizó por triplicado.

6.7.2 Resistencia a V en fase estacionaria.

Para la determinación de la resistencia a V en la fase estacionaria de crecimiento, a partir del precultivo (crecido durante 18 horas), se inocularon tubos con 5mL de caldo LB (dilución 1/100) y se incubaron a 37°C con agitación, con concentraciones de 50, 100 y 200 mM de la sal vanadio (NaVO₃). La solución de vanadio fue agregada a las 24 horas de crecimiento, que es el tiempo necesario para que el cultivo llegue a fase estacionaria. Finalizado el periodo de crecimiento en presencia del V, se realizó la siembra en placas con agar LB, por el método de titulación por gotas. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18h. Se tomó en cuenta la mínima concentración a la cual no se observó crecimiento después del inóculo como el valor al cual la cepa es sensible al V. La siembra se realizó por triplicado.

6.7.3 Determinación de parámetros microbiológicos.

Partiendo de los resultados obtenidos en las distintas fases de crecimiento a las diferentes concentraciones de NaVO_3 , en relación con los datos correspondientes en ausencia de NaVO_3 , se estimaron los siguientes parámetros:

- **Fracción de supervivencia** (SF_x) de las células tratadas con NaVO_3 , que representa la relación que existe entre UFC tratadas (UFC_{trat}) y UFC sin tratamiento (UFC_{control}) en un momento dado ($SF_x = UFC_{\text{trat}x} / UFC_{\text{control}x}$)
- **Logaritmo de reducción de la viabilidad** (LR_x), el cual es el recíproco de SF cuando es transformado a escala logarítmica, por lo que alternativamente se puede calcular como la resta de los logaritmos de las UFC_{trat} menos las UFC_{control} ($LR_x = \log_{10}(UFC_{\text{control}x}) - \log_{10}(UFC_{\text{trat}x})$). Los valores negativos y/o cercanos a 0 significa que no hubo reducción de la viabilidad, mientras que valores positivos cercanos al $\log_{10}(UFC_{\text{control}})$ significa que hubo reducción de la viabilidad.

6.8 Aislamiento de plásmidos movilizados.

Para el aislamiento del DNA plasmídico de las bacterias transconjugantes se empleó la minipreparación TENS y el método de lisis alcalina. Para cada experimento se inocularon 1.5 mL de caldo LB durante 24 horas a 37°C , conteniendo cada una de las cepas, tanto las transconjugantes como las cepas aisladas en el CMDLT.

Mini preparación TENS:

Se centrifugó a 13.500 g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el sedimento celular en 200 μL de TENS (10 mM Tris- HCl pH 8, 1 mM de EDTA pH 8, 0,1N NaOH, 0,5 % SDS). Se mezcló en el vórtex. Se agregaron 100 μL de acetato de sodio 3M pH 5,2. Se mezcló en el vórtex y luego se centrifugó por 5 minutos. Se transfieren 200 μL del

sobrenadante a un tubo Eppendorf. Se agregaron 500 μ L de etanol al 100%. Se mezcló en el vórtex, se incubó por 5 minutos y se centrifugó a por 10 minutos. Se tomo la fase acuosa y se agregaron 500 μ L de etanol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en 50 μ L de de agua destilada y 1 μ L de RNAsa. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Lisis alcalina:

Se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó en 5 mL de medio líquido, y se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C en agitación. Las células se centrifugaron a 13.500 g por 1 minuto. El sedimento se resuspendió en 500 mL de solución salina (0,85% NaCl) y fue centrifugado a 13.500 g por 1 minuto. Se añadieron 100 μ L de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 1M, Tris-HCl 0,5 M, pH 8) y se resuspendió completamente el sedimento celular. Seguidamente se agregaron 200 μ L de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1%), mezclándose cuidadosamente por inversión, permitiendo la lisis en frio durante 5 minutos. Se añadieron 150 μ L de solución III fría (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial, pH 4,5) mezclándose suavemente. Se incubó en hielo durante 5 minutos, luego se centrifugó a 13.500 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y se le realizó una extracción con un volumen de mezcla de cloroformo:fenol (1:1). Se mezcló y se centrifugó durante 2 minutos. La fase acuosa se recuperó para precipitar el DNA a través de la adición de 2,5 volúmenes de etanol 100 % (v/v). Se centrifugó a 13.500 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se lavó con etanol 70% (v/v) y se centrifugó durante 3 min. Se descartó el sobrenadante, y una vez que el DNA plasmídico estuvo completamente seco, se resuspendió en 50 μ L de agua destilada. Se almacenó a -20 °C hasta su uso

6.9 Electroforesis en geles de agarosa.

El gel se preparó utilizando la agarosa en buffer TBE 1X (Tris-HCl 0,089M, ácido bórico 0,089M, EDTA 0,002M, pH 8,0). Una vez polimerizado el gel de agarosa, se colocó en la

cámara de electroforesis, se añadió el buffer TBE 1X. Se procedió a cargar la muestra con un buffer de carga (azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol 0,25% y glicerol 50%). Se cargó el marcador de peso molecular. Se inició la corrida electroforética, y al finalizar se procedió a la visualización del gel.

Visualización del gel. Se trató con bromuro de etidio por 15 minutos aproximadamente, y luego se lavó con agua destilada durante 5 min para quitar el exceso.

Registro de la imagen del gel. Luego del tratamiento, el gel se observó en un equipo de foto documentación Gel Doc XR+, de la casa comercial BioRaD, la imagen obtenida fue registrada con IMAGE LAB 3.0.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la resistencia a distintos antimicrobianos. Identificación Microbiológica.

Con el fin de evaluar la capacidad de algunas bacterias de presentar el fenotipo de resistencia a una sal de vanadio, en este estudio se realizaron pruebas con 12 aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de pacientes ambulatorios que presentaban ITU. Para realizar dichos ensayos fue necesario evaluar y ratificar los fenotipos de los aislados previamente identificados, mediante pruebas en medio LB suplementado con antibióticos, además de pruebas bioquímicas para corroborar la identificación de los aislados.

En el 2007, Angiolillo, en su T.E.G., determinó el perfil de resistencia ante distintos antibióticos, para 50 aislados de *E. coli* causantes de I.T.U. utilizados en el presente trabajo. En la tabla III se muestran los porcentajes obtenidos de los resultados del autor (Angiolillo, 2007).

Tabla III. Porcentajes de aislados resistentes entre los 50 aislados ensayados, provenientes de pacientes ambulatorios con ITU.

AMK	TZP	NIT	SAM	GEN	CIP	CEP	PIP	AMP	SXT
2 % R	8 % R	8 % R	14 % R	24 % R	54 % R	74 % R	86 % R	90 % R	100 % 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.

Angiolillo también determinó que el 100% de estos 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. Estos resultados se resumen en la tabla I, en la sección de materiales y métodos.

En el 2013, Bazdikian, en su T.E.G., determinó el perfil de resistencia ante distintas sales de metales tóxicos, a los 50 aislado de *E. coli* estudiados por Angiolillo.

Tabla IV. Resumen de los resultados de las pruebas fenotípicas de los 50 aislados, ante diferentes sales de metales.

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 diferente de 100%. En rojo se muestran los porcentajes de aislados sin crecimiento distinto de 0. (Tomado de Bazdikian 2013)

Entre los valores utilizados se encuentran: mayor concentración de Cloruro de Bario a 500 mM, Cloruro de Cobalto: 2 mM, Sulfato de Cobre: 5 mM, Cloruro de Estroncio: 100 Mm y Molibdato de Sodio: 350 mM.

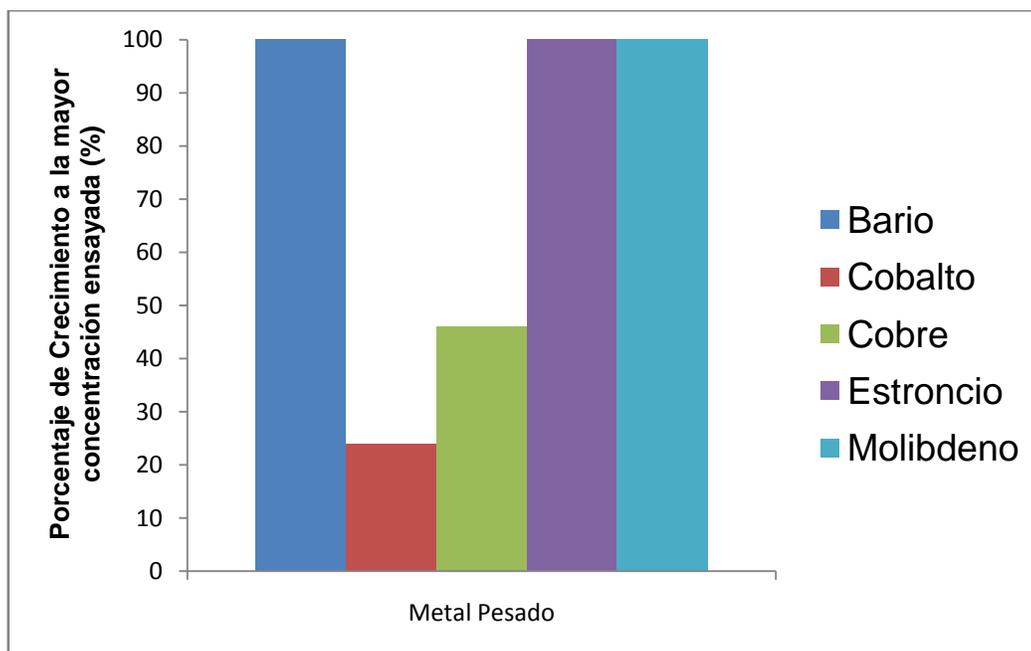


Figura 7. Resultados de las pruebas fenotípicas realizadas para los 50 aislados, de la concentración más alta ensayada para cada sal.

Los resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos, realizados por Bazdikian 2013 demostraron que con Cloruro de bario ($BaCl_2$), Cloruro de estroncio ($SrCl_2$) y Molibdato de sodio (Na_2MoO_4), no se alcanzó la MIC. El autor no ensayó valores mayores debido a que las concentraciones utilizadas ya eran altas y el volumen a agregar al medio de cultivo era excesivo.

En el presente estudio se realizaron pruebas bioquímicas con la finalidad de ratificar la identificación a nivel de especie de los aislados. En la tabla VI se observan los resultados para las pruebas Simmons Citrato, Agar Hierro Kliger, H₂S-Indol-Motilidad (S.I.M.).

Tabla V. Resumen de los resultados de las pruebas bioquímicas de los aislados estudiados.

Aislados	Simmons Citrato	Kliger	S	I	M
J62-2(Control Negativo)	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
U329 (Control Positivo)	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
3213	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
3372	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
3742	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
3992	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4259	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4375	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4388	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4569	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4662	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4715	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4729	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+
4739	-	Amarillo /Amarillo	-	+	+

Simmons Citrato: - No utiliza Citrato como fuente de carbono. **Agar hierro Kliger:** Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): Fermentación de la Lactosa y Glucosa. **S.I.M:** - Sin producción de H₂S, Indol: +, Motilidad: +

La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas (Farmer, 1995). *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*, y sus principales características bioquímicas se indican en la tabla VI. Estas características concuerdan con los resultados reportados en la tabla V. De esta forma para este estudio se ratifica tanto el género como la especie de los aislados.

Tabla VI. Identificación bioquímica de *Escherichia coli*.

Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Omitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
KCN crecimiento en	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98

Tomado y modificado de: Farmer, 1995.

El % de positividad, significa el porcentaje reportado para *E. coli*, de respuesta positiva a la prueba bioquímica referida.

7.2 Determinación del Fenotipo de resistencia a la sal de Vanadio.

Una vez recuperados los aislados bacterianos objeto de estudio, y ratificados los fenotipos para la identificación bioquímica de los aislados, se procedió a determinar los porcentajes de cepas que presentaron resistencia a la sal Vanadato de Sodio.

Se realizaron ensayos fenotípicos de concentraciones variadas, para la sal Vanadato de sodio (NaVO_3).

Para los ensayos de fenotipo, de resistencia a vanadato de sodio, las cepas fueron puestas a crecer en medio líquido durante 24 horas, suplementadas con distintas concentraciones de esta sal. De las concentraciones ensayadas, los 12 aislados presentaron un 100 % de crecimiento ante la concentración más alta evaluada (200mM). En la tabla VII se muestran los resultados.

Tabla VII. Resultados obtenidos en los ensayos a los 12 aislados, con distintas concentraciones de vanadato de sodio.

Aislados	S.M.	50 mM	75 mM	100 mM	200 mM
J62-2	+	-	-	-	-
U329	+	+	+	+	+
3213	+	+	+	+	+
3372	+	+	+	+	+
3742	+	+	+	+	+
3992	+	+	+	+	+
4259	+	+	+	+	+
4375	+	+	+	+	+
4388	+	+	+	+	+
4569	+	+	+	+	+
4662	+	+	+	+	+
4715	+	+	+	+	+
4729	+	+	+	+	+
4739	+	+	+	+	+

+: Crecimiento; -: No creció S.M: Sin Metal

En la figura 8, se muestra el resumen de los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas de resistencia a diversas concentraciones de vanadato de sodio. Los resultados demostraron que el 100% de los aislados, sin incluir el control negativo (*E. coli* J62-2), presentaron capacidad de crecimiento a todas las concentraciones ensayadas.

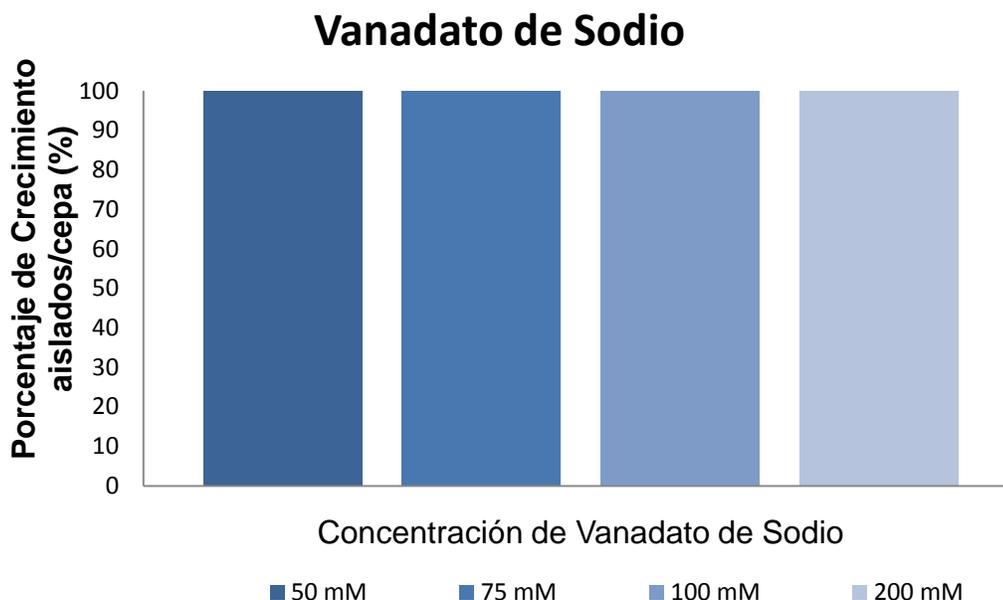


Figura 8.- Resultados obtenidos en los ensayos de fenotipo de los 12 aislados y los controles positivo y negativo, a diversas concentraciones de vanadato de sodio.

La MIC no pudo ser alcanzada, y la mayor concentración probada en los distintos ensayos permitió verificar crecimiento en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

Con estos resultados obtenidos para las pruebas fenotípicas de resistencia, se obtuvo la información requerida para el proceso de conjugación, conociéndose ahora la concentración necesaria para el crecimiento de las transconjugantes, que además inhibe el crecimiento de la cepa receptora. Así, las transconjugantes fueron crecidas en placas de LB suplementadas con presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

7.3 Determinación de la resistencia a la sal de Vanadio en las distintas fases de crecimiento bacteriano.

A partir del precultivo de cada aislado (crecido a 37 °C durante 14 a 16 horas en agitación constante) se realizó una dilución 1:100 en caldo LB y se incubó a 37 °C en un rotor. A esta dilución se le determinó la densidad óptica (DOx) a diferentes tiempos (0, 2, 4, 5, 24 y 48 h). Se determinaron también las UFC para los tiempos 0, 2, 4, 5, 24 y 48 h; con el que se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada aislado, en medio sin metal y a concentraciones crecientes de la sal estudiada.

En la tabla VIII, se muestran los resultados de las unidades de D.O. obtenidos en la medición realizada a distintos tiempos de crecimiento. Estas lecturas abarcan las distintas fases de crecimiento 0, 2, 4, y 5 horas (para la fase exponencial) y 24 y 48 horas (para la fase estacionaria). Esta medición se realizó con los aislados en crecimiento de forma libre en caldo LB, con un espectrofotómetro a 600 nm. Los valores reportados son el promedio de 3 repeticiones.

Tabla VIII. Unidades de D.O. en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, creciendo en ausencia de la sal del metal (NaVO₃).

AISLADO	D.O T= 0 h	D.O T= 2 h	D.O T= 4 h	D.O T= 5 h	D.O T= 24 h	D.O T= 48 h
J62-2	0,005	0,070	0,284	0,505	0,849	0,920
U329	0,020	0,191	0,637	1,087	1,763	1,815
3213	0,001	0,314	0,769	1,324	2,107	2,237
3372	0,025	0,387	0,774	1,174	2,442	2,532
3742	0,015	0,621	0,856	0,966	2,001	2,206
3992	0,030	0,621	0,869	1,161	1,788	1,891
4259	0,020	0,310	0,488	0,793	1,911	2,281
4375	0,005	0,262	1,023	1,215	1,991	2,332
4388	0,053	0,142	0,703	1,050	1,799	1,876
4569	0,015	0,265	0,896	1,065	2,253	2,396
4662	0,005	0,287	0,869	1,059	1,740	1,961
4715	0,035	0,242	0,669	0,920	2,169	2,376
4729	0,040	0,309	0,890	0,991	1,608	1,873
4739	0,025	0,245	0,659	1,103	1,864	1,993

En el grafico 1, se puede observar la curva de crecimiento bacteriano de las unidades de D.O. vs el tiempo en horas, con los valores de las unidades de D.O. obtenidos previamente. También se muestra en detalle, con escala ampliada para la fase exponencial del crecimiento de cada aislado.

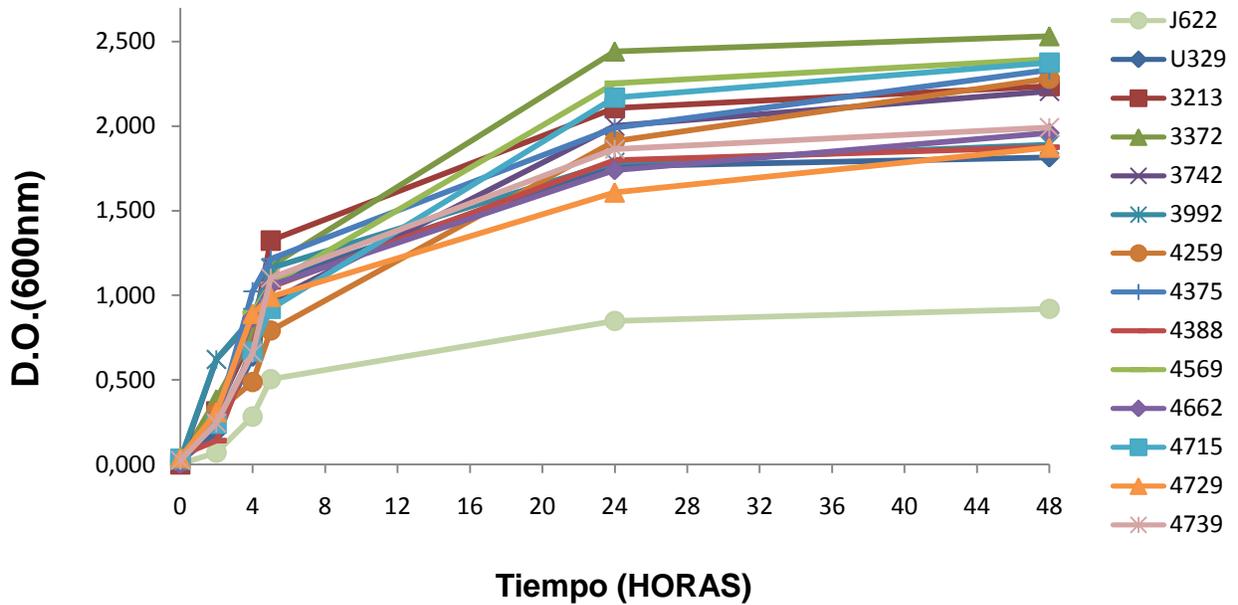
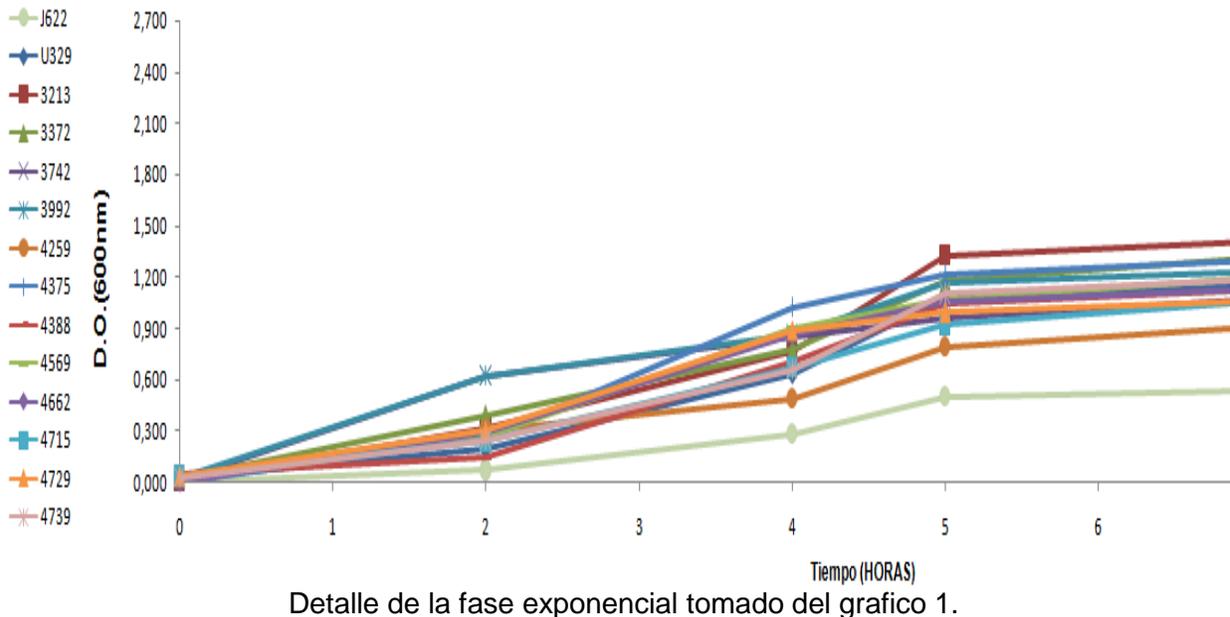


Grafico 1. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiado, en medio sin la sal del metal.



Detalle de la fase exponencial tomado del grafico 1.

Tabla IX. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en ausencia de la sal del metal (NaVO_3).

AISLADO	UFC T= 0 h	UFC T= 2 h	UFC T= 4 h	UFC T= 5 h	UFC T= 24 h	UFC T= 48 h
J62-2	1,2E+06	2,7E+08	2,8E+09	3,2E+09	4,5E+09	4,7E+09
U329	5,5E+06	3,3E+08	3,9E+09	4,3E+09	4,6E+09	4,8E+09
3213	1,7E+06	8,0E+08	4,20E+09	4,7E+09	5,6E+09	5,7E+09
3372	4,6E+06	2,6E+08	2,2E+09	3,6E+09	4,6E+09	4,9E+09
3742	3,2E+06	2,1E+08	4,0E+09	5,3E+09	6,2E+09	6,3E+09
3992	3,5E+06	3,0E+08	3,7E+09	4,3E+09	5,4E+09	5,5E+09
4259	2,4E+06	3,2E+08	4,9E+09	5,2E+09	6,3E+09	6,2E+09
4375	3,6E+06	3,3E+08	3,0E+09	4,0E+09	5,1E+09	5,3E+09
4388	3,1E+06	4,4E+08	3,1E+09	4,3E+09	5,2E+09	5,3E+09
4569	2,0E+06	2,8E+08	3,5E+09	4,5E+09	5,6E+09	5,3E+09
4662	2,3E+06	4,5E+08	3,3E+09	4,7E+09	5,5E+09	5,8E+09
4715	5,0E+06	3,1E+08	2,2E+09	3,5E+09	6,6E+09	6,8E+09
4729	5,2E+06	4,2E+08	4,4E+09	5,3E+09	6,6E+09	6,7E+09
4739	3,2E+06	2,8E+08	4,5E+09	5,0E+09	6,3E+09	6,5E+09

En la tabla IX, se muestran los resultados obtenidos para el número de las unidades formadoras de colonias obtenidos para los distintos tiempos estudiados, de los aislados crecidos en LB en ausencia de la sal de vanadio. Los valores se obtuvieron para las 0, 2, 4, 5, 24 y 48 horas de crecimiento.

En el grafico 2, se muestra el crecimiento bacteriano de los aislados en estudio crecidos en ausencia de la sal de vanadio, en función del $\text{Ln}(\text{U.F.C.})$ vs el tiempo en horas, utilizando los datos mostrados en la tabla IX. También se muestra en detalle del crecimiento en la fase exponencial de crecimiento.

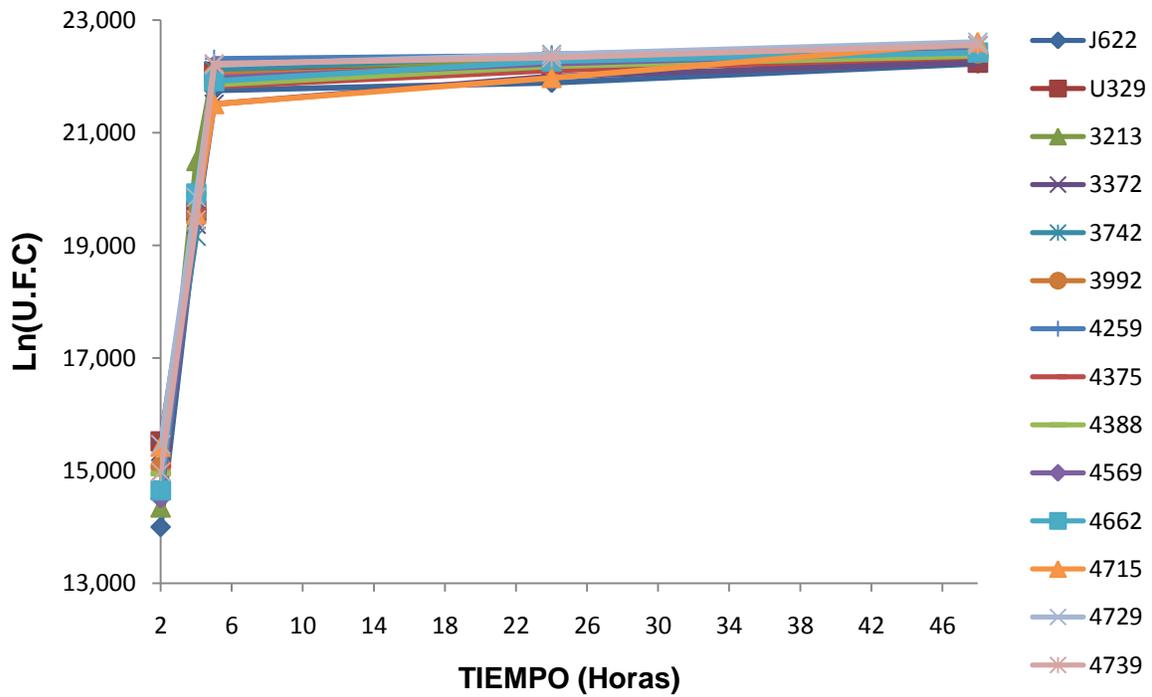
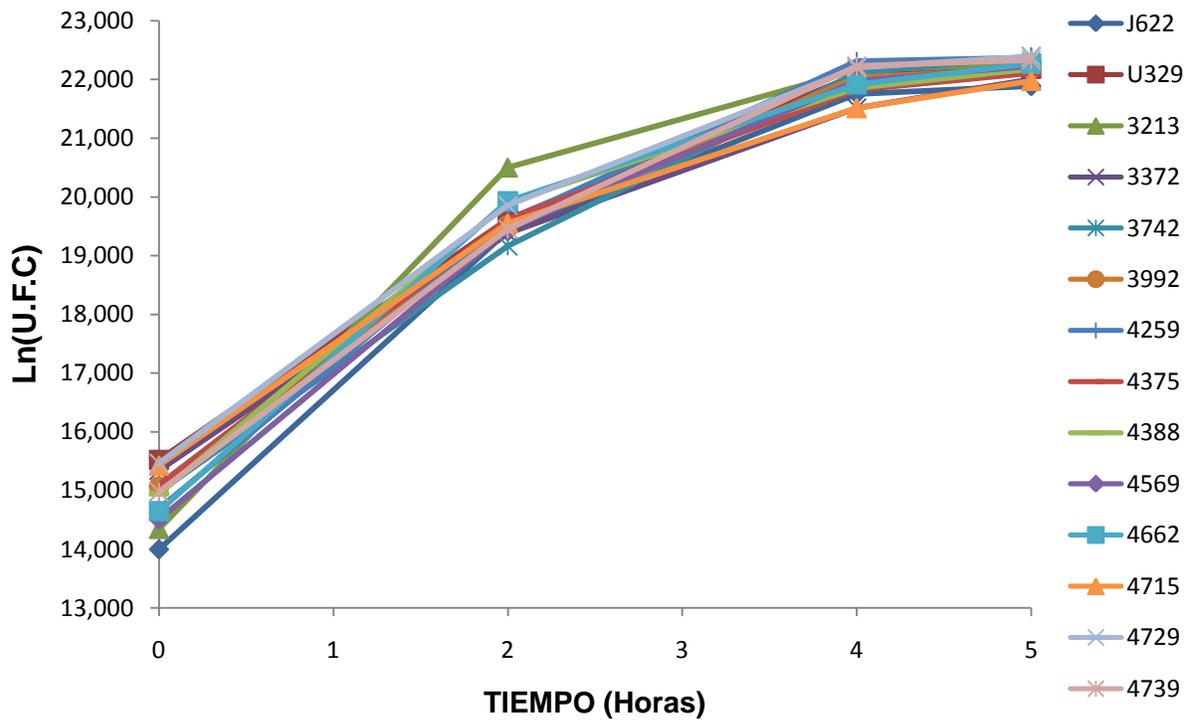


Grafico 2. Crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiado.



Detalle de la fase exponencial tomado del grafico 2.

Para los ensayos de resistencia frente a la sal de vanadio, se agregó en medio líquido, luego de realizar la dilución 1:100 del precultivo, el volumen necesario para suplementar con las distintas concentraciones de la sal de vanadio ensayadas. A continuación se muestran los resultados obtenidos para estos ensayos. Todos los resultados en conjunto demuestran la capacidad de los aislados estudiados, de crecer en todas las concentraciones ensayadas, en las distintas fases de crecimiento.

En la tabla X, se muestran los resultados en los distintos tiempos estudiados, 0, 2, 4 y 5 horas (para la fase exponencial) y 24 y 48 horas (para la fase estacionaria). Se muestran las U.F.C. para cada tiempo y también se muestra la D.O. del tiempo 0 horas, que representa el valor control, antes de agregar la sal de vanadio

Tabla X. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

AISLADO	D.O. T= 0 h	UFC T= 0 h	UFC T= 2 h	UFC T= 4 h	UFC T= 5 h	UFC T= 24 h	UFC T= 48 h
J62-2	0,010	3,7E+06	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02
U329	0,020	7,5E+06	2,7E+07	1,3E+08	9,3E+08	1,2E+09	3,3E+08
3213	0,010	1,7E+05	4,4E+05	1,3E+06	6,6E+07	1,0E+09	1,4E+08
3372	0,131	8,6E+05	1,3E+06	3,3E+06	2,0E+08	2,6E+09	8,6E+08
3742	0,005	1,2E+06	1,0E+07	1,3E+08	1,3E+08	6,0E+08	1,4E+08
3992	0,005	2,5E+06	4,6E+06	6,6E+06	7,3E+06	2,6E+09	5,3E+08
4259	0,176	2,4E+05	2,0E+06	1,6E+07	2,3E+08	3,6E+08	3,2E+08
4375	0,040	1,6E+06	1,0E+07	6,0E+07	8,0E+08	3,5E+09	1,9E+09
4388	0,005	3,1E+06	1,4E+07	3,5E+07	2,6E+08	6,0E+08	5,0E+08
4569	0,020	2,00E+04	3,2E+05	2,0E+06	5,3E+06	6,6E+08	4,0E+08
4662	0,010	3,3E+06	5,3E+06	8,0E+06	1,3E+08	2,5E+09	3,3E+08
4715	0,055	9,0E+06	1,4E+07	1,3E+08	2,6E+08	8,0E+08	1,3E+08
4729	0,005	2,4E+06	1,50E+07	5,80E+07	6,60E+08	2,00E+09	1,00E+09
4739	0,010	2,2E+06	2,0E+07	6,6E+08	1,2E+09	1,8E+09	1,1E+09

En el grafico 3, se muestra el crecimiento bacteriano de los aislados estudiados, en presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3), expresado en el $\text{Ln}(\text{U.F.C.})$ vs el tiempo en horas. También se muestra el detalle de la fase exponencial.

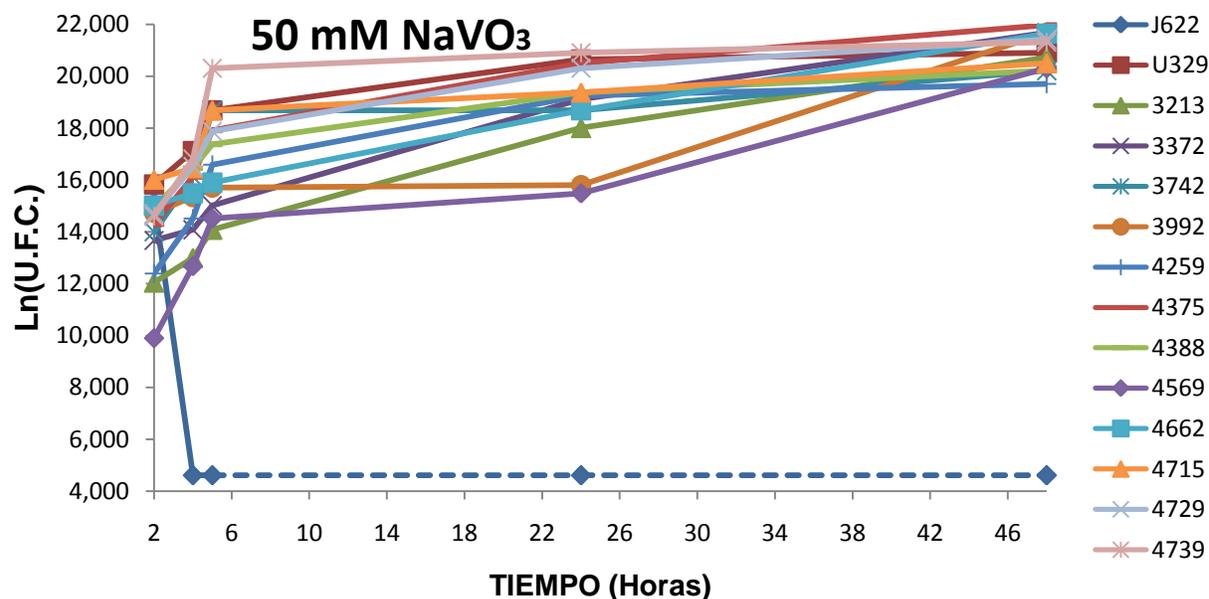
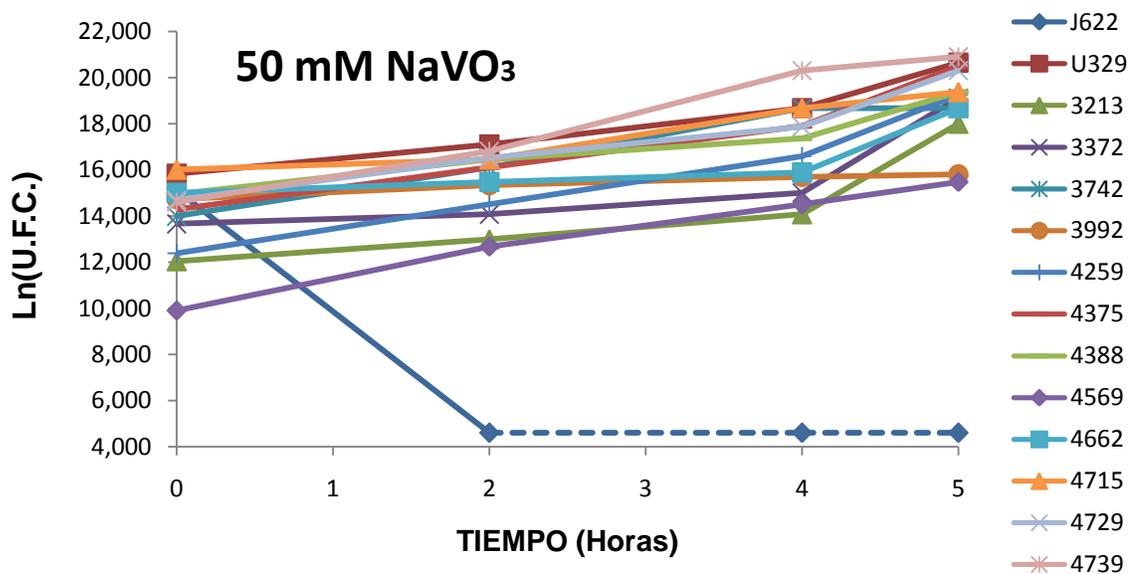


Grafico 3. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiados, en un medio en presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).



Detalle de la fase exponencial tomado del grafico 3.

En la tabla XI, se muestran los resultados en los distintos tiempos estudiados, 0, 2, 4 y 5 horas (para la fase exponencial) y 24 y 48 horas (para la fase estacionaria). Se muestran las U.F.C. para cada tiempo y también se muestra la D.O. del tiempo 0 horas, que representa el valor control, antes de agregar la sal de vanadio.

Tabla XI. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en presencia de 100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

AISLADO	D.O. T= 0 h	UFC T= 0 h	UFC T= 2 h	UFC T= 4 h	UFC T= 5 h	UFC T= 24 h	UFC T= 48 h
J62-2	0,005	3,7E+06	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02
U329	0,010	7,5E+06	2,0E+07	4,0E+07	5,3E+08	2,0E+09	8,0E+08
3213	0,020	1,7E+05	2,1E+07	3,7E+07	1,9E+08	4,0E+08	2,6E+08
3372	0,445	8,6E+05	2,6E+07	4,6E+08	6,0E+08	7,3E+08	8,0E+07
3742	0,005	1,2E+06	3,0E+07	4,5E+08	7,2E+08	1,0E+09	3,3E+08
3992	0,005	2,5E+06	1,6E+07	2,8E+07	5,0E+08	4,6E+09	2,0E+08
4259	0,052	2,4E+05	2,6E+07	7,0E+07	2,6E+08	3,3E+08	1,3E+08
4375	0,015	1,6E+06	5,6E+07	8,3E+07	6,2E+08	8,6E+08	1,3E+08
4388	0,005	3,1E+06	2,0E+08	4,6E+08	8,0E+08	1,4E+09	6,6E+07
4569	0,054	2,00E+04	1,0E+07	3,3E+08	4,6E+08	2,0E+08	7,2E+07
4662	0,045	3,3E+06	5,4E+07	2,6E+08	3,9E+08	8,0E+08	7,3E+08
4715	0,110	9,0E+06	2,2E+07	2,3E+08	7,6E+08	1,0E+09	3,3E+08
4729	0,010	2,4E+06	6,60E+07	1,30E+08	9,00E+08	1,30E+09	4,80E+07
4739	0,005	2,2E+06	2,0E+07	4,0E+07	3,3E+08	7,6E+08	2,0E+08

En el grafico 4, se muestra el crecimiento bacteriano en las distintas fases de estudio, frente a una concentración de la sal de vanadio de 100 mM; expresando el $\text{Ln}(\text{U.F.C.})$ vs el tiempo medido en horas. También se muestra un detalle de la fase exponencial (0, 2, 4 y 5 horas).

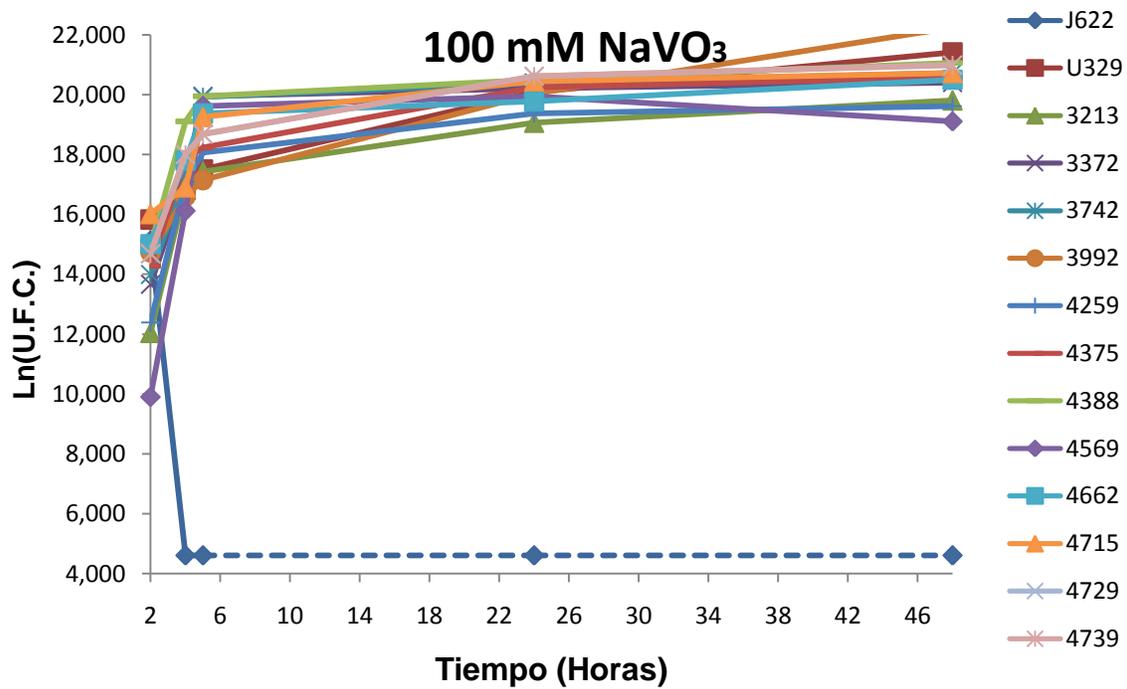
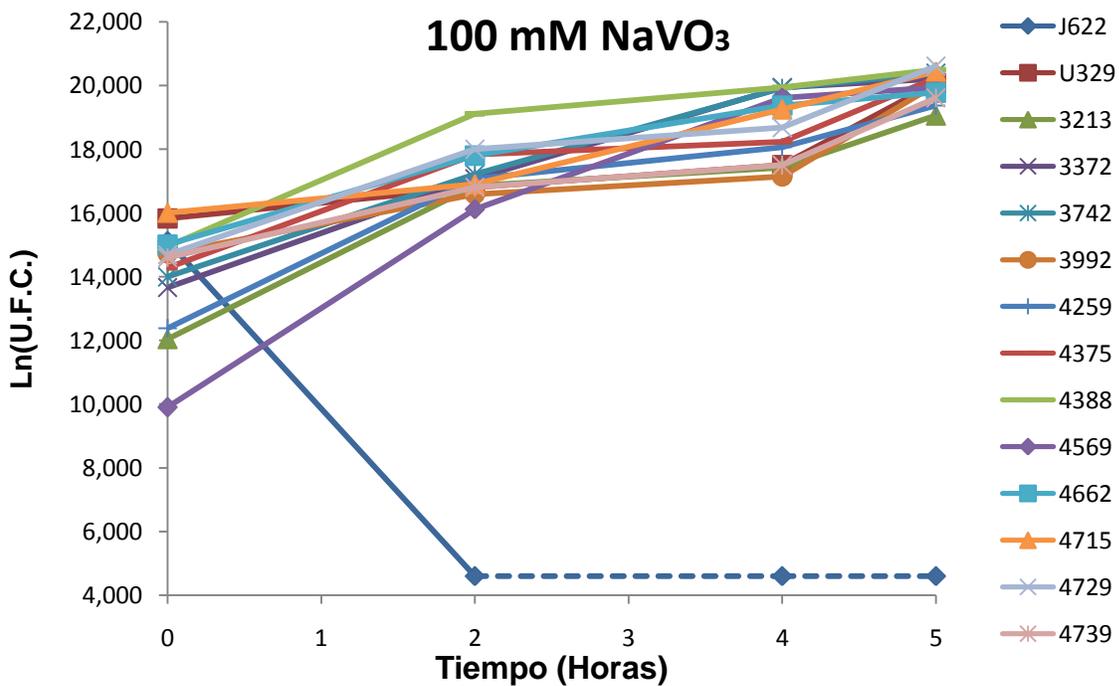


Grafico 4. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento estudiados, en un medio en presencia de 100 mM de la sal de vanadio (NaVO₃).



Detalle de la fase exponencial tomado del grafico 4.

En la tabla XII, se muestran los resultados en los distintos tiempos estudiados, 0, 2, 4 y 5 horas (para la fase exponencial) y 24 y 48 horas (para la fase estacionaria). Del crecimiento bacteriano en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

Tabla XII. U.F.C en los diferentes tiempos de medición para cada aislado estudiado, en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

AISLADO	D.O. T= 0 h	UFC T= 0 h	UFC T= 2 h	UFC T= 4 h	UFC T= 5 h	UFC T= 24 h	UFC T= 48 h
J62-2	0,005	3,7E+06	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02
U329	0,010	5,5E+06	6,0E+06	3,4E+06	1,8E+06	1,6E+06	1,0E+06
3213	0,020	1,7E+05	5,7E+06	2,4E+06	2,2E+06	1,6E+06	1,2E+06
3372	0,445	5,6E+05	6,6E+06	6,4E+06	3,7E+06	3,2E+06	2,1E+06
3742	0,005	1,2E+06	4,0E+06	3,6E+06	2,5E+06	2,0E+06	2,0E+06
3992	0,005	2,5E+06	8,0E+06	7,5E+06	6,0E+06	4,2E+06	2,4E+06
4259	0,052	2,4E+05	6,4E+06	4,6E+06	4,0E+06	2,4E+06	1,4E+06
4375	0,015	1,6E+06	6,0E+06	4,5E+06	3,1E+06	2,7E+06	2,1E+06
4388	0,005	3,1E+06	4,0E+06	3,4E+06	2,2E+06	2,0E+06	1,7E+06
4569	0,054	2,0E+06	4,9E+06	4,0E+06	1,9E+06	1,2E+06	1,1E+06
4662	0,045	2,3E+06	3,5E+06	2,9E+06	2,8E+06	1,8E+06	1,4E+06
4715	0,110	7,0E+06	8,8E+06	2,7E+06	1,6E+06	1,3E+06	1,1E+06
4729	0,010	2,4E+06	4,4E+06	3,7E+06	2,1E+06	1,6E+06	1,1E+06
4739	0,005	5,2E+06	8,0E+06	7,3E+06	4,2E+06	1,4E+06	1,2E+06

En el grafico 5, se muestra el crecimiento bacteriano de los aislados estudiados, en la grafica se pueden observar el $\text{Ln}(\text{U.F.C.})$ vs el tiempo medido en horas. Estos aislados crecieron en un medio en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3), para las distintas fases de estudio. También se muestra un detalle de la fase exponencial.

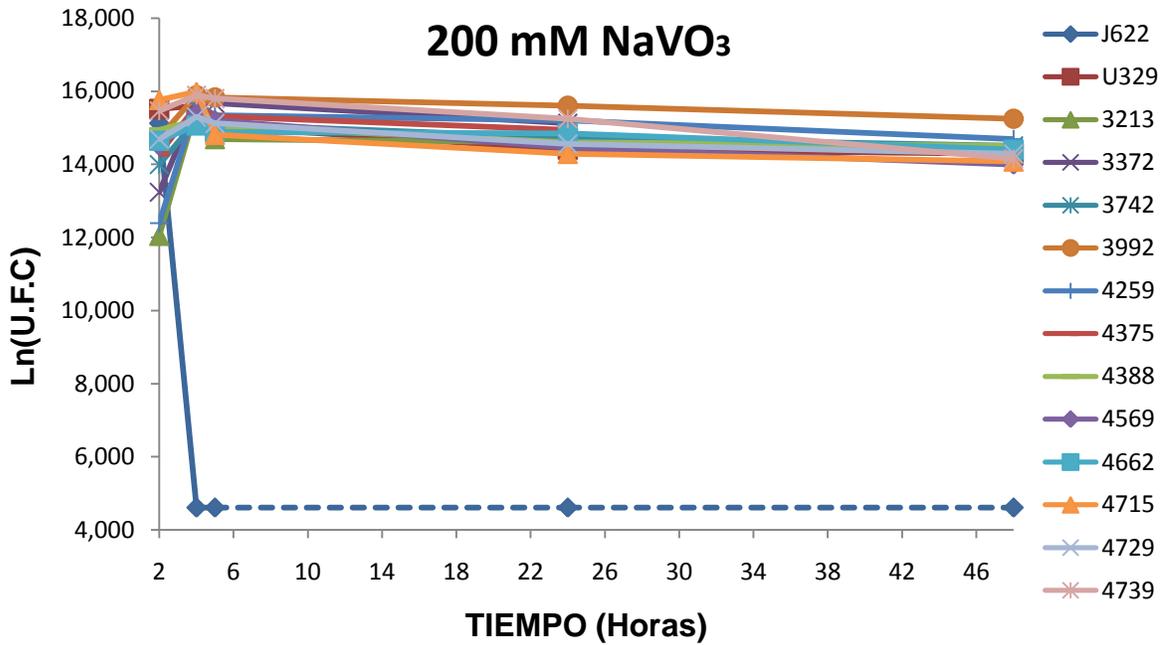
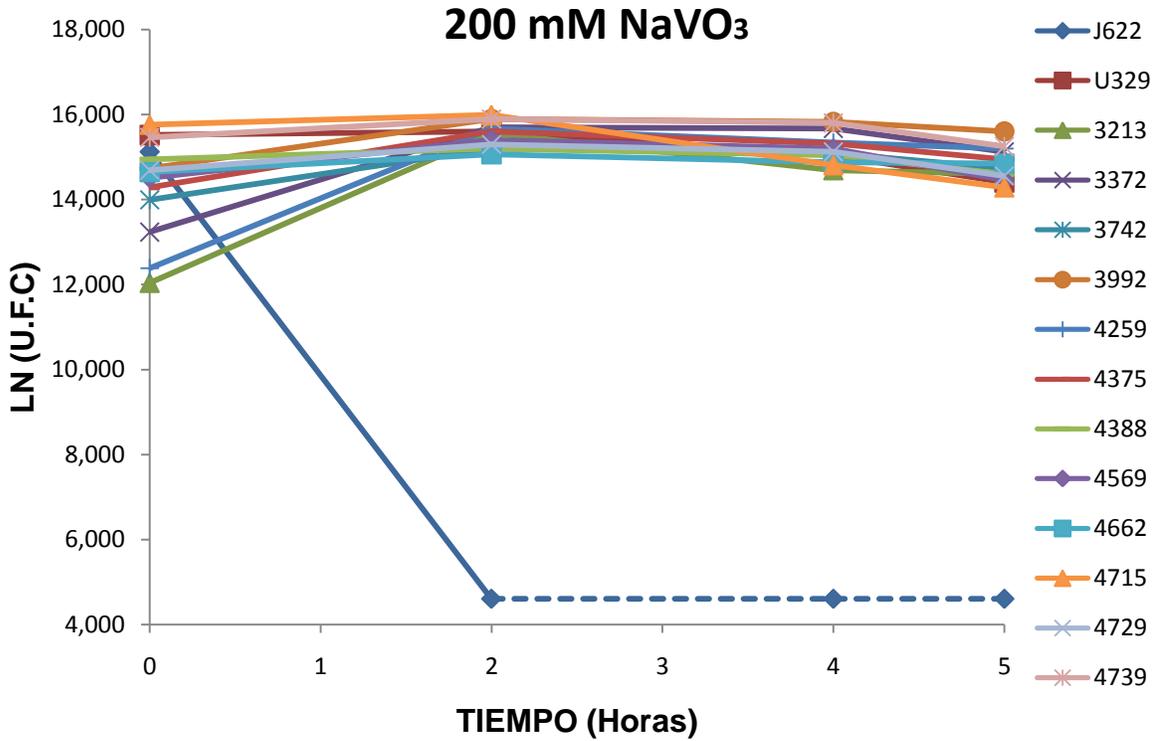


Grafico 5. Curva de crecimiento bacteriano en las distintas fases de crecimiento



Detalle de la fase exponencial tomado del grafico 5.

Partiendo de los resultados obtenidos en las distintas fases de crecimiento a las diferentes concentraciones de NaVO₃ (50, 100 y 200 Mm), en relación con los datos correspondientes en ausencia de NaVO₃, se estimaron los parámetros presentados en el punto 6.7 de la sección de métodos.

En base a esto se presentan a continuación las tablas, con los resultados de los parámetros para cada aislado, también se presentan las graficas asociados a los cálculos.

El factor de supervivencia, es el valor que relaciona las células tratadas con respecto al control, este valor nos indica cuantas células sobreviven (Comparando las U.F.C.) frente a un tratamiento específico. Para este estudio, los tratamientos son las distintas concentraciones de la sal de vanadio.

Tabla XIII. Fracción de supervivencia del tratamiento a 50 mM de la sal de vanadio.

SF (50 mM)/ AISLADOS	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h
J62-2	3,7E-07	3,6E-08	3,1E-08	2,2E-08	2,1E-08
U329	8,2E-02	3,3E-02	2,2E-01	2,6E-01	6,9E-02
3213	5,5E-04	3,1E-04	1,4E-02	1,8E-01	2,5E-02
3372	5,0E-03	1,5E-03	5,6E-02	5,7E-01	1,8E-01
3742	4,8E-02	3,3E-02	2,5E-02	9,7E-02	2,2E-02
3992	1,5E-02	1,8E-03	1,7E-03	4,8E-01	9,6E-02
4259	6,3E-03	3,3E-03	4,4E-02	5,7E-02	5,2E-02
4375	3,0E-02	2,0E-02	2,0E-01	6,9E-01	3,6E-01
4388	3,2E-02	1,1E-02	6,0E-02	1,2E-01	9,4E-02
4569	1,1E-03	5,7E-04	1,2E-03	1,2E-01	7,5E-02
4662	1,2E-02	2,4E-03	2,8E-02	4,5E-01	5,7E-02
4715	4,5E-02	5,9E-02	7,4E-02	1,2E-01	1,9E-02
4729	3,6E-02	1,3E-02	1,2E-01	3,0E-01	1,5E-01
4739	7,1E-02	1,5E-01	2,4E-01	2,9E-01	1,7E-01

Formula: $(SF_x = UFC_{tratx} / UFC_{controlx})$

En la tabla XIII, se muestran los valores obtenidos para la fracción de supervivencia. Estos valores indican, con respecto al control, cuantos microorganismos están siendo afectados, frente a una concentración de vanadio 50 mM. Un valor de 10^{-7} para el caso de J62-2 a T= 2 horas, indica que de las $2,7 \times 10^8$ U.F.C. control (tabla X); al menos 10^7 U.F.C. Están siendo afectadas por la presencia de la sal de vanadio a 50 mM. Los

valores de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , son valores menores de células afectadas. Estos valores denotan que existe un mayor número de sobrevivientes con respecto al control, a medida que la notación se hace mayor.

En el grafico 6, se muestra en barras para los distintos tiempos estudiados, el número de células afectadas, en presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3). Las barras más altas denotan que hay un mayor número de sobrevivientes, con respecto a aquellas que son más bajas, y aquellas que no se ven, es indicativo de la muerte de las células. Según los resultados obtenidos, se puede concluir que las células resistentes al metal ensayado, sobreviven favorablemente a los efectos de la sal de vanadio a una concentración de 50mM a las 24 horas de crecimiento.

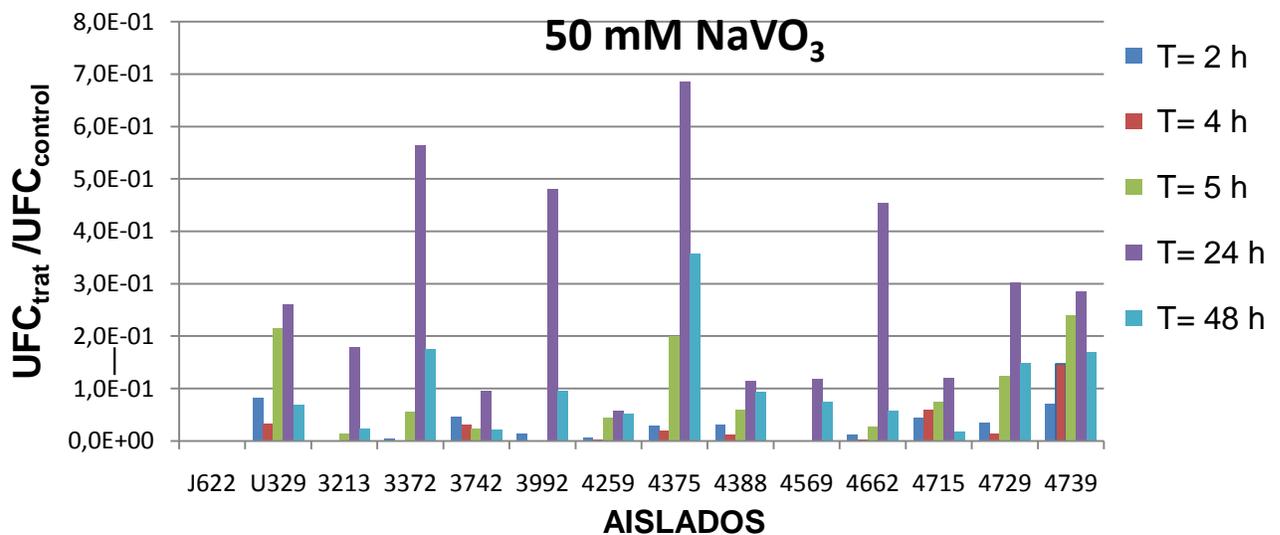


Grafico 6. Fracción de supervivencia de los aislados estudiados, en las distintas fases de crecimiento, en presencia de 50mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

En la tabla XIV, se muestran los valores obtenidos para la fracción de supervivencia, estos valores indican con respecto al control, cuantos microorganismos están siendo afectados, en este caso para una concentración de la sal de vanadio de 100 mM.

Tabla XIV. Fracción de supervivencia del tratamiento a 100 mM de la sal de vanadio.

SF (100 mM)/ AISLADOS	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h
J62-2	3,6E-08	3,6E-08	3,1E-08	2,2E-08	2,1E-08
U329	5,1E-03	1,0E-02	1,2E-01	4,3E-01	1,7E-01
3213	5,0E-03	8,8E-03	4,0E-02	7,1E-02	4,6E-02
3372	1,2E-02	2,1E-01	1,7E-01	1,6E-01	1,6E-02
3742	7,5E-03	1,1E-01	1,4E-01	1,6E-01	5,2E-02
3992	4,3E-03	7,6E-03	1,2E-01	8,5E-01	3,6E-02
4259	5,3E-03	1,4E-02	5,0E-02	5,2E-02	2,1E-02
4375	1,9E-02	2,8E-02	1,6E-01	1,7E-01	2,5E-02
4388	6,5E-02	1,5E-01	1,9E-01	2,7E-01	1,2E-02
4569	2,9E-03	9,4E-02	1,0E-01	3,6E-02	1,4E-02
4662	1,6E-02	7,9E-02	8,3E-02	1,5E-01	1,3E-01
4715	1,0E-02	1,0E-01	2,2E-01	1,5E-01	4,9E-02
4729	1,5E-02	3,0E-02	1,7E-01	2,0E-01	7,2E-03
4739	4,4E-03	8,9E-03	6,6E-02	1,2E-01	3,1E-02

Formula: $(SF_x = UFC_{tratx} / UFC_{controlx})$

En el gráfico 7, se muestra en un gráfico de barras, para los distintos tiempos estudiados, el número de células afectadas, en presencia de 100 mM de la sal de vanadio ($NaVO_3$). Nuevamente, las barras más altas denotan que hay un mayor número de sobrevivientes. Puede observarse que a las 24 horas (fase estacionaria), las células sobreviven más, con respecto a la fase exponencial.

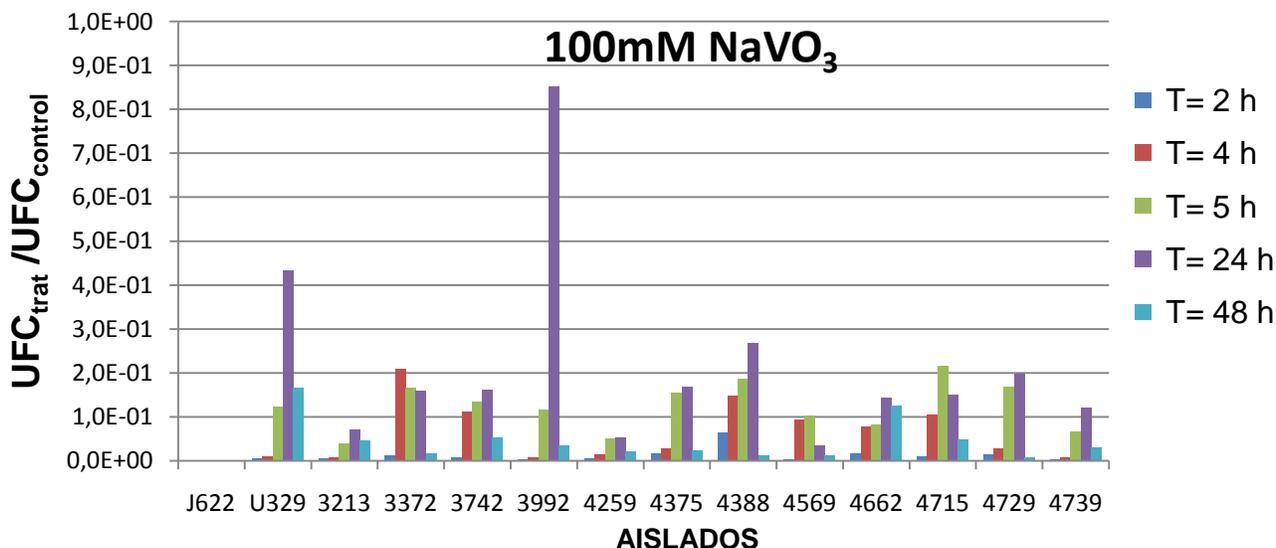


Grafico 7. Fracción de supervivencia de los aislados estudiados, en las distintas fases de crecimiento, en presencia de 100 mM de la sal de vanadio ($NaVO_3$).

En la tabla XV, se muestran los valores obtenidos para la fracción de supervivencia, estos valores indican con respecto al control, al igual que para las otras concentraciones, cuantos microorganismos están siendo afectados. En este caso, a un concentración de la sal de vanadio de 200 mM.

Tabla XV. Fracción de supervivencia del tratamiento a 200 mM de la sal de vanadio.

SF (200 mM)/ AISLADOS	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h
J62-2	3,7E-07	3,6E-08	3,1E-08	2,2E-08	2,1E-08
U329	1,8E-02	8,7E-04	4,2E-04	3,5E-04	2,1E-04
3213	7,1E-03	5,7E-04	4,7E-04	2,9E-04	2,1E-04
3372	2,5E-02	2,9E-03	1,0E-03	7,0E-04	4,3E-04
3742	1,9E-02	9,0E-04	4,7E-04	3,2E-04	3,2E-04
3992	2,7E-02	2,0E-03	1,4E-03	7,8E-04	4,4E-04
4259	2,0E-02	9,4E-04	7,7E-04	3,8E-04	2,3E-04
4375	1,8E-02	1,5E-03	7,8E-04	5,3E-04	4,0E-04
4388	9,1E-03	1,1E-03	5,1E-04	3,8E-04	3,2E-04
4569	1,8E-02	1,1E-03	4,2E-04	2,1E-04	2,0E-04
4662	7,8E-03	8,8E-04	6,0E-04	3,3E-04	2,4E-04
4715	2,8E-02	1,2E-03	4,6E-04	2,0E-04	1,6E-04
4729	1,0E-02	8,4E-04	4,0E-04	2,4E-04	1,6E-04
4739	2,9E-02	1,6E-03	8,4E-04	2,2E-04	1,8E-04

Formula: $(SF_x = UFC_{tratx} / UFC_{controlx})$

En el grafico 8, se muestra en un gráfico de barras, para los distintos tiempos estudiados, el número de células afectadas, en presencia de 200 mM de la sal de vanadio ($NaVO_3$). En estas condiciones se observa el mayor número de sobrevivientes solamente a las 2 horas de exposición al metal, en todos los aislados bacterianos.

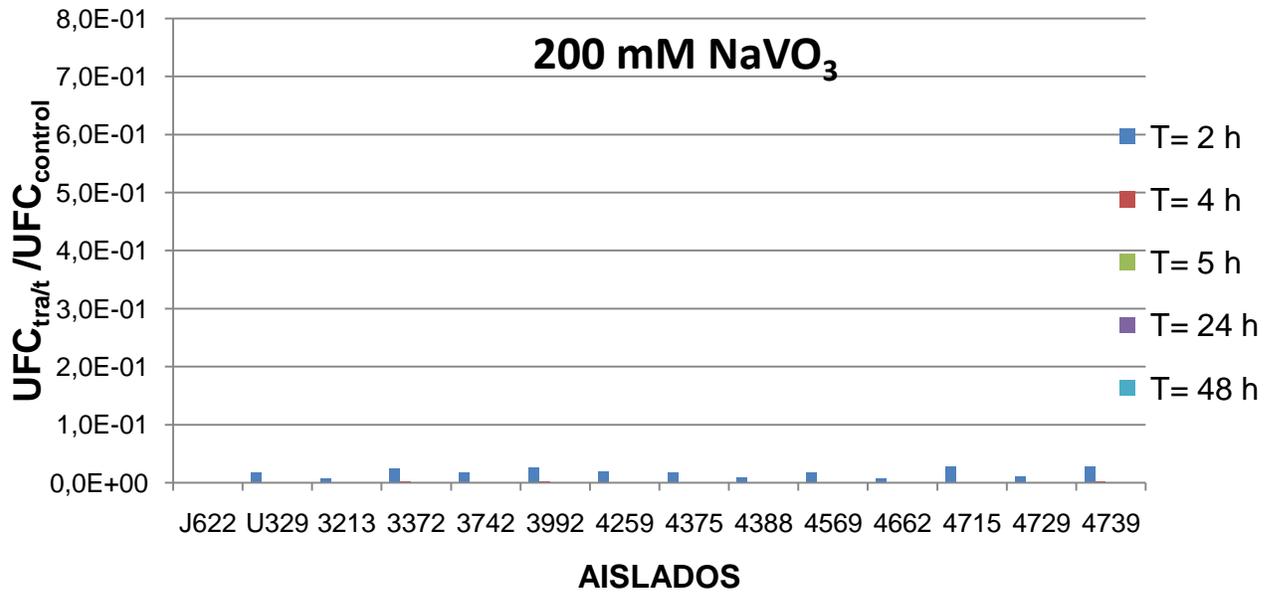


Grafico 8. Fracción de supervivencia de los aislados estudiados, en las distintas fases de crecimiento, en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3)

La expresión de la reducción logarítmica de la viabilidad, es un término matemático que se utiliza en microbiología para mostrar el número relativo de microorganismos vivos, eliminados de una superficie mediante la desinfección o limpieza o por exposición a un agente antimicrobiano. Por ejemplo, una "reducción de 5-log" significa reducir el número de microorganismos en 100.000 veces, es decir, si inicialmente eran 100.000 microorganismos presentes, una reducción de 5 log sería reducir el número de microorganismos a uno.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos para la reducción logarítmica, de cada aislado en las distintas concentraciones ensayadas. En la tabla XVI, se expresan los valores obtenidos para las U.F.C. control.

Tabla XVI. Logaritmo en base 10 de las U.C.F. control.

LOG 10 CONTROL					
AISLADO	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h
J62-2	8,43	9,45	9,51	9,65	9,67
U329	8,52	9,59	9,63	9,66	9,68
3213	8,90	9,62	9,67	9,75	9,76
3372	8,41	9,34	9,56	9,66	9,69
3742	8,32	9,60	9,72	9,79	9,80
3992	8,48	9,57	9,63	9,73	9,74
4259	8,51	9,69	9,72	9,80	9,79
4375	8,52	9,48	9,60	9,71	9,72
4388	8,64	9,49	9,63	9,72	9,72
4569	8,45	9,54	9,65	9,75	9,72
4662	8,65	9,52	9,67	9,74	9,76
4715	8,49	9,34	9,54	9,82	9,83
4729	8,62	9,64	9,72	9,82	9,83
4739	8,45	9,65	9,70	9,80	9,81

En la tabla XVII, se muestran los valores obtenidos de las U.F.C. en presencia de de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3), y de el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), para cada tiempo estudiado. Se observa con el LR, el número de microorganismos que son afectados frente a la concentración ensayada. El valor de 6.43, para el caso de J62-2 a las 2 horas, significa que se redujo el número de microorganismos en 1.000.000 veces (10^6 veces), en relación al número inicial de microorganismos presentes ($2,7 \times 10^8$)

Tabla XVII. Logaritmo en base 10 (LOG 10) de las U.C.F. y el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), en presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

Aislado	LOG 10					LR(X)				
	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h
J62-2	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	6,43	7,45	7,51	7,65	7,67
U329	7,43	8,11	8,97	9,08	8,52	1,09	1,48	0,66	0,58	1,16
3213	5,64	6,11	7,82	9,00	8,15	3,26	3,51	1,85	0,75	1,61
3372	6,11	6,52	8,30	9,41	8,93	2,30	2,82	1,26	0,25	0,76
3742	7,00	8,11	8,11	8,78	8,15	1,32	1,49	1,61	1,01	1,65
3992	6,66	6,82	6,86	9,41	8,72	1,81	2,75	2,77	0,32	1,02
4259	6,30	7,20	8,36	8,56	8,51	2,20	2,49	1,35	1,24	1,29
4375	7,00	7,78	8,90	9,54	9,28	1,52	1,70	0,70	0,16	0,45
4388	7,15	7,54	8,41	8,78	8,70	1,50	1,95	1,22	0,94	1,03
4569	5,51	6,30	6,72	8,82	8,60	2,94	3,24	2,93	0,93	1,12
4662	6,72	6,90	8,11	9,40	8,52	1,93	2,62	1,56	0,34	1,24
4715	7,15	8,11	8,41	8,90	8,11	1,35	1,23	1,13	0,92	1,72
4729	7,18	7,76	8,82	9,30	9,00	1,45	1,88	0,90	0,52	0,83
4739	7,30	8,82	9,08	9,26	9,04	1,15	0,83	0,62	0,54	0,77

h= horas

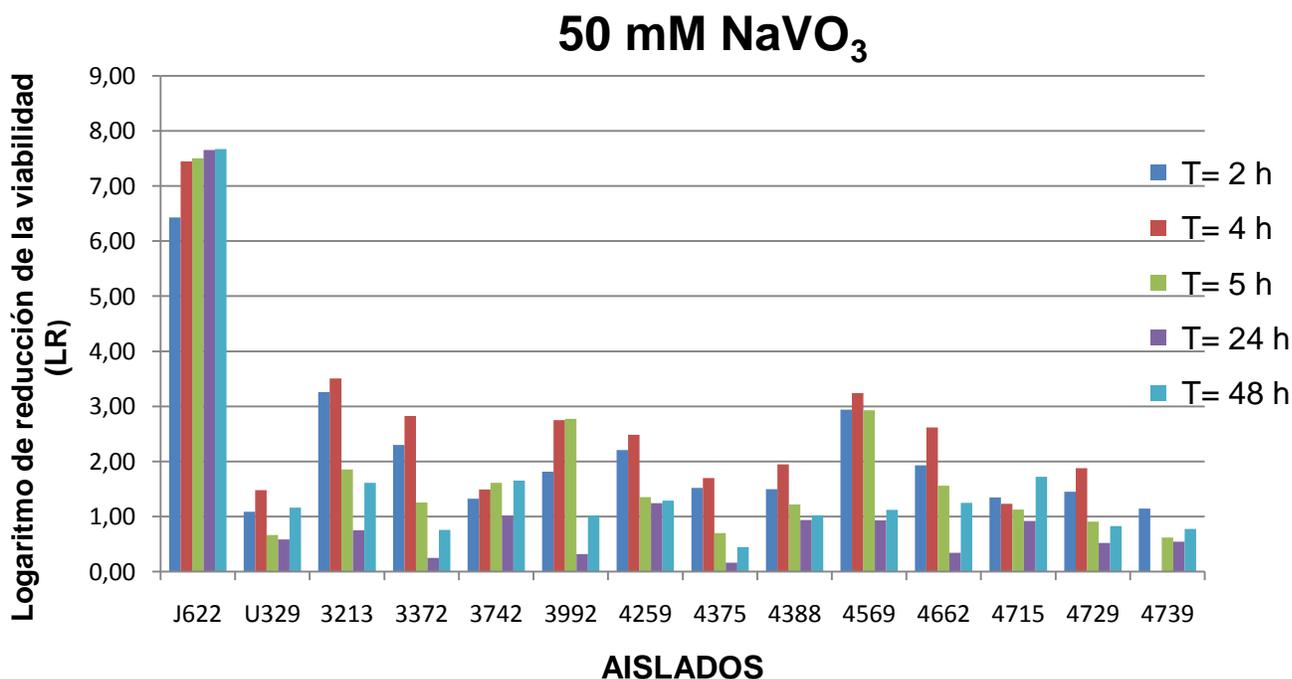


Grafico 9. Logaritmo de reducción de la viabilidad de los aislados de estudios, en las distintas fases de crecimiento en presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

En el gráfico 9, se muestran los gráficos de barras, para cada aislado y en los tiempos estudiados, los valores asociados al logaritmo de reducción de la viabilidad. Las barras más altas están relacionadas con una reducción mayor, de los microorganismos en presencia de 50 mM de la sal de vanadio (NaVO_3). Se observa una mayor reducción en los tiempos de 2, 4 y 5 horas, correspondientes a la fase exponencial del crecimiento bacteriano.

En la tabla En la tabla XVIII, se muestra el logaritmo en base 10 de las U.C.F. en presencia de de 100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3), y de el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), para cada tiempo estudiado. Se observa con el LR, el número de microorganismos que son afectados frente a la concentración ensayada.

Tabla XVIII. Logaritmo en base 10 (LOG 10) de las U.C.F. y el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), en presencia de 100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

AISLADO	LOG 10					LR(X)				
	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h
J62-2	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	6,43	7,45	7,51	7,65	7,67
U329	7,30	7,60	8,72	9,30	8,90	1,22	1,99	0,91	0,36	0,78
3213	7,32	7,57	8,28	8,60	8,41	1,58	2,06	1,39	1,15	1,34
3372	7,41	8,66	8,78	8,86	7,90	1,00	0,68	0,78	0,80	1,79
3742	7,48	8,65	8,86	9,00	8,52	0,85	0,95	0,87	0,79	1,28
3992	7,20	7,45	8,70	9,66	8,30	1,27	2,12	0,93	0,07	1,44
4259	7,41	7,85	8,41	8,52	8,11	1,09	1,85	1,30	1,28	1,68
4375	7,75	7,92	8,79	8,93	8,11	0,77	1,56	0,81	0,77	1,61
4388	8,30	8,66	8,90	9,15	7,82	0,34	0,83	0,73	0,57	1,90
4569	7,00	8,52	8,66	8,30	7,86	1,45	1,03	0,99	1,45	1,87
4662	7,73	8,41	8,59	8,90	8,86	0,92	1,10	1,08	0,84	0,90
4715	7,34	8,36	8,88	9,00	8,52	1,15	0,98	0,66	0,82	1,31
4729	7,82	8,11	8,95	9,11	7,68	0,80	1,53	0,77	0,71	2,14
4739	7,30	7,60	8,52	8,88	8,30	1,15	2,05	1,18	0,92	1,51

h= horas.

En el gráfico 10, se muestran los gráficos de barra, para cada aislado y en los tiempos estudiados, los valores asociados al logaritmo de reducción de la viabilidad. Las barras más altas están relacionadas con una reducción mayor, de los microorganismos en presencia de 100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

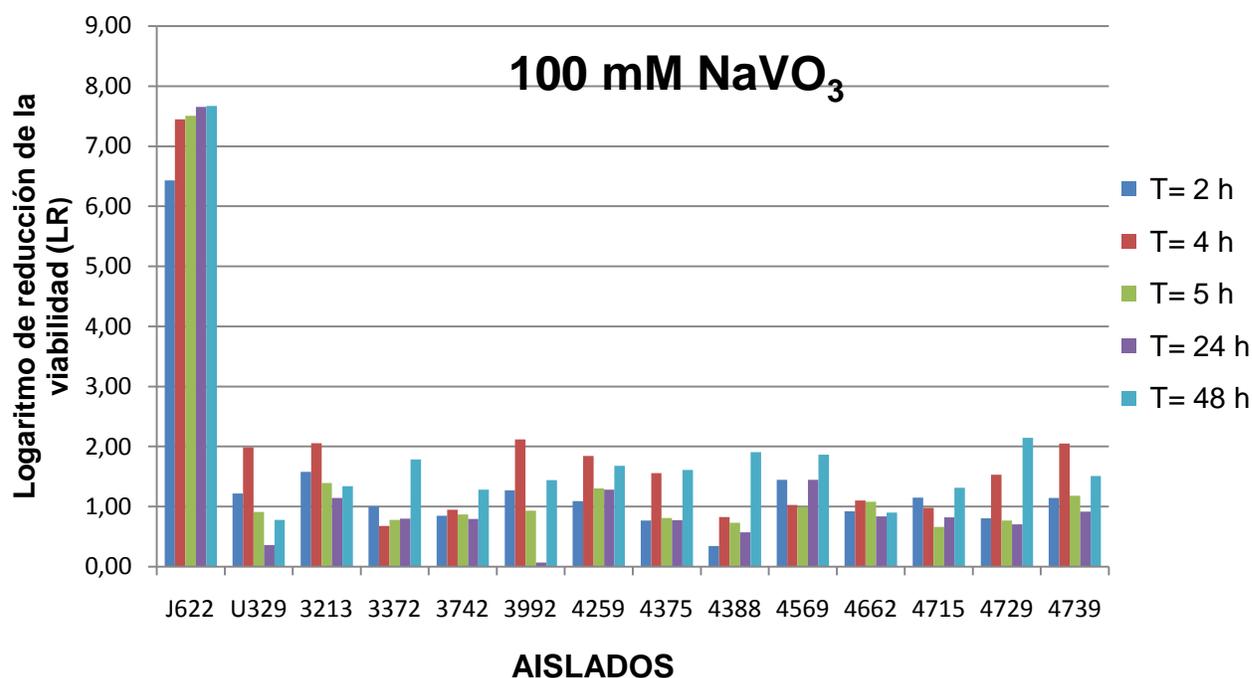


Gráfico 10. Logaritmo de reducción de la viabilidad de los aislados de estudios, en las distintas fases de crecimiento en presencia de 100 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

En la tabla XIX, se muestra el logaritmo en base 10 de las U.F.C. en presencia de de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3), y de el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), para cada tiempo estudiado. Se observa con el LR, el número de microorganismos que son afectados frente a la concentración ensayada.

Tabla XIX. Logaritmo en base 10 (LOG 10) de las U.C.F. y el logaritmo de reducción de la viabilidad (LR), en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

AISLADO	LOG 10					LR(X)				
	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h	T= 2 h	T= 4 h	T= 5 h	T= 24 h	T= 48 h
J62-2	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	6,43	7,45	7,51	7,65	7,67
U329	6,78	6,53	6,26	6,20	6,00	1,74	3,06	3,38	3,46	3,68
3213	6,76	6,38	6,34	6,20	6,08	2,15	3,24	3,33	3,54	3,68
3372	6,82	6,81	6,57	6,51	6,32	1,60	2,54	2,99	3,16	3,37
3742	6,60	6,56	6,40	6,30	6,30	1,72	3,05	3,33	3,49	3,50
3992	6,90	6,88	6,78	6,62	6,38	1,57	2,69	2,86	3,11	3,36
4259	6,81	6,66	6,60	6,38	6,15	1,70	3,03	3,11	3,42	3,65
4375	6,78	6,65	6,49	6,43	6,32	1,74	2,82	3,11	3,28	3,40
4388	6,60	6,53	6,34	6,30	6,23	2,04	2,96	3,29	3,41	3,49
4569	6,69	6,60	6,28	6,08	6,03	1,76	2,94	3,37	3,67	3,70
4662	6,54	6,46	6,45	6,26	6,15	2,11	3,06	3,22	3,49	3,62
4715	6,94	6,43	6,20	6,11	6,04	1,55	2,91	3,34	3,71	3,79
4729	6,64	6,57	6,32	6,20	6,04	1,98	3,08	3,40	3,62	3,78
4739	6,90	6,86	6,62	6,15	6,08	1,54	2,79	3,08	3,65	3,73

h= horas.

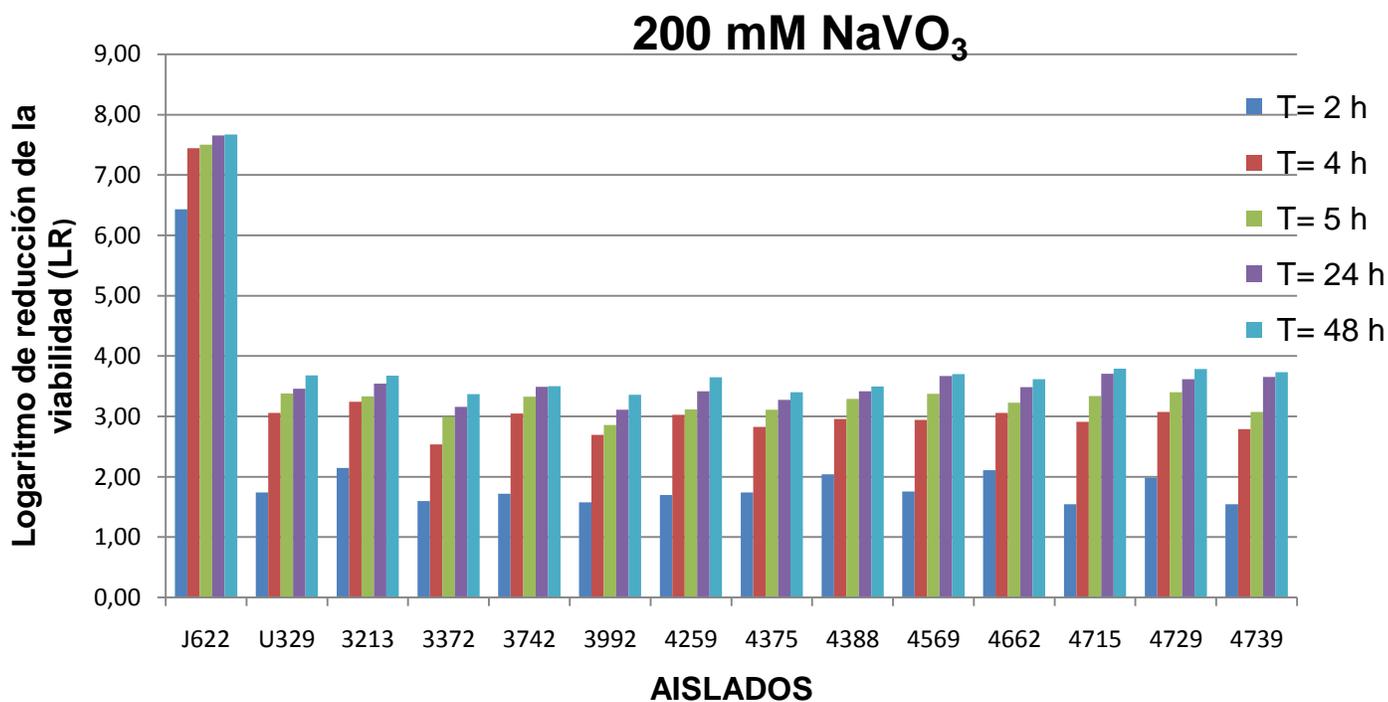


Gráfico 11. Logaritmo de reducción de la viabilidad de los aislados de estudios, en las distintas fases de crecimiento en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3).

En el gráfico 11, se muestran los gráficos de barra, para cada aislado y en los tiempos estudiados, los valores asociados al logaritmo de reducción de la viabilidad, donde las barras más altas están relacionadas con una reducción mayor, de los microorganismos en presencia de 200 mM de la sal de vanadio (NaVO_3). Se observa como a mayor concentración existe una mayor reducción en los microorganismos, para este ensayo es notable el aumento a las 24 y 48 horas de estudio.

7.4 Proceso de conjugación bacteriana. Determinación de la frecuencia de transferencia.

En los ensayos fenotípicos se logró determinar el valor de la concentración mínima inhibitoria de la sal de vanadio para la cepa control, la cual se utilizaría como cepa receptora (*E. coli* J62-2). Se realizaron los procesos de conjugación con los distintos aislados bacterianos que presentaron resistencia evidenciada como capacidad de crecimiento.

A fines de determinar la capacidad de movilización de los marcadores que confieren resistencia ante el vanadato de sodio (NaVO_3), los experimentos de conjugación fueron llevados a cabo utilizando como donantes los aislados: 3213, 3372, 3742, 3992, 4259, 4375, 4388, 4569, 4662, 4715, 4729 y 4739, los cuales resultaron portadores del fenotipo de resistencia según las pruebas fenotípicas reportadas en las secciones anteriores. Se realizaron las pruebas siguiendo el protocolo indicado en la sección de materiales y métodos, utilizando como marcador de selección vanadato de sodio 50 mM.

En la tabla XXI, se resumen los resultados de los títulos de las donantes y de los títulos de las transconjugantes para cada experimento. Se determinaron los valores de la frecuencia de transferencia de los genes que confieren resistencia a la concentración de vanadato de sodio que se ensayó.

Se encontró que el menor valor de frecuencia de transferencia se obtuvo con la transconjugante T3742, la cual fue de $8,46 \times 10^{-4}$ células transconjugantes/ células donantes. Este valor indica que de cada diez mil células, al menos 8 fueron capaces de transferir los genes de resistencia a la concentración de 50 mM. El valor más elevado de la frecuencia de transferencia se registró en T4259, presentando un registro de $1,87 \times 10^{-3}$ células transconjugantes/ células donantes. Este valor que de cada mil células, al menos 2 fueron capaces de transferir los genes de resistencia a la concentración utilizada de la sal de vanadio. Entre estas cepas utilizadas como donantes solo una cepa bacteriana no transfirió determinantes de resistencia en las condiciones ensayadas. Esta cepa es la donante 3992.

Tabla XX. Resultados de las conjugaciones realizadas con el marcador de vanadato de sodio (NaVO_3) 50 mM

Aislados	Título Donantes (cel/mL)	Título Transconjugantes (cel/mL)	Frecuencia de Conjugación (cel transc/cel donantes)
U329	2,70E+09	1,40E+06	5,19E-04
3213	2,60E+09	1,06E+06	4,08E-04
3372	8,60E+08	8,60E+05	1,00E-03
3742	2,60E+09	2,20E+06	8,46E-04
3992	3,30E+09	0,00E+00	0,00E+00
4259	4,60E+08	8,60E+05	1,87E-03
4375	3,30E+09	1,60E+06	4,85E-04
4388	2,00E+09	1,46E+06	7,30E-04
4569	3,30E+09	1,06E+06	3,21E-04
4662	1,40E+09	1,40E+06	1,00E-03
4715	1,30E+09	1,60E+06	1,23E-03
4729	6,00E+08	1,10E+05	1,83E-04
4739	2,20E+09	1,30E+06	5,91E-04

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

7.5 Aislamiento del DNA plasmídico.

Una vez obtenidos las cepas transconjugantes se procedió a realizar el aislamiento de las moléculas plasmídicas presentes, tanto las provenientes de las células donantes, como de las células transconjugantes.

En las figuras 9 y 10, se muestra el registro fotográfico de los productos de aislamiento del DNA plasmídico de las 12 cepas bacterianas utilizadas como donantes en los experimentos de conjugación, provenientes del CMDLT, a partir de las cuales se obtuvo la población de transconjugantes para la sal de metal pesado ensayado NaVO_3 . Los resultados mostrados es el material obtenidos por ambos métodos de aislamiento de DNA plasmídico descritos en la sección de materiales y métodos.

Los resultados indican la presencia de DNA plasmídico en estas cepas, se pudieron observar bandas superiores a las 20 Kb, lo cual sugiere la presencia de moléculas de DNA de alto peso molecular, variando entre una y 4 bandas observadas. En todos los experimentos de aislamientos de plásmidos se uso como control positivo, la cepa U329, y como control negativo la cepa J62-2.

Para el aislado bacteriano a partir del cual no se obtuvo una población de transconjugantes, la donante 3992, los resultados indican la presencia de DNA plasmídico en esa cepa. Este resultado sugiere que DNA plasmídico puede no contener los genes que codifican para la resistencia a la sal de metal ensayado, o estos plásmidos no fueron estables en la cepa receptora, o no son transmisibles.

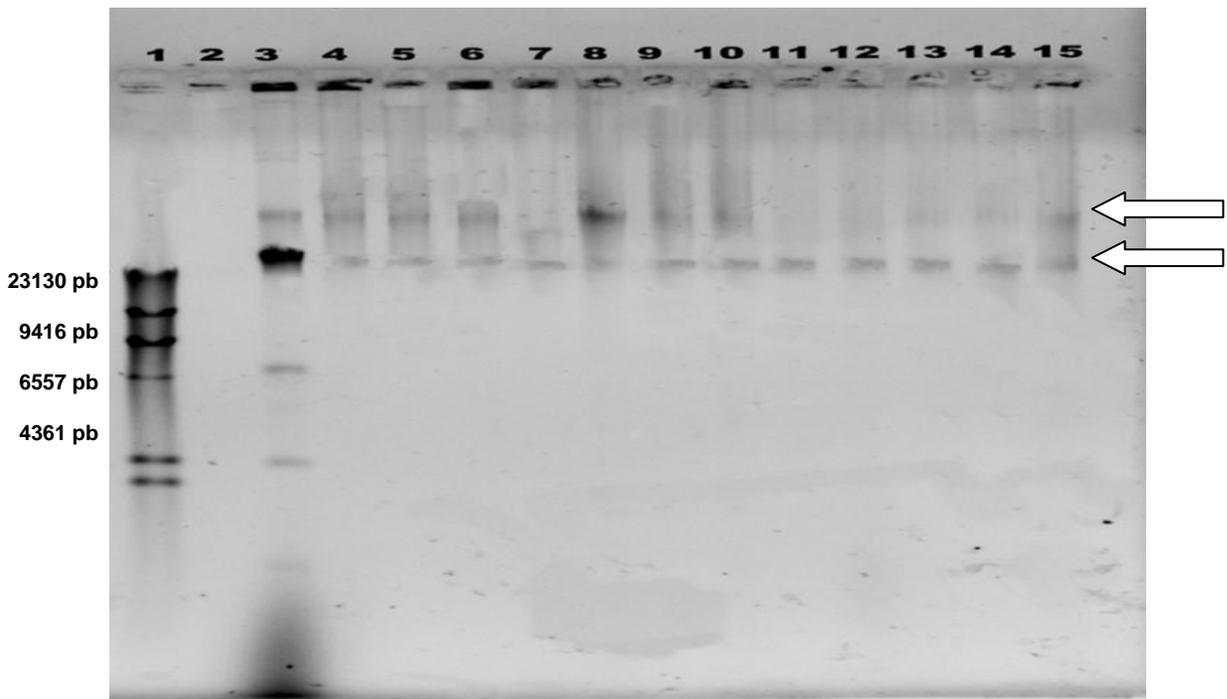


Figura 9. Registro Fotográfico del aislamiento plasmídico de las cepas Donantes (Método: TENS); **Carril-Muestra:** 1- λ HindIII, 2-J62-2 (Control -), 3-U329 (Control +), 4-3213, 5-3372, 6-3992,7-4569, 8-4388, 9-4739, 10-4259, 11-4662, 12-3742, 13-4715, 14-4375, 15-4729. Las flechas muestran la altura de las probables moléculas plasmídicas.



Figura 10. Registro Fotográfico del aislamiento plasmídico de las cepas Donantes (Método: Lisis Alcalina); **Carril-Muestra:** 1- λ HindIII, 2-J62-2 (Control -), 3-U329 (Control +), 4-3213, 5-3372, 6-3742,7-3992, 8-4259, 9-4375, 10-4388, 11-4569, 12-4662, 13-4715, 14-4729, 15-4739. Las flechas muestran la altura de las probables moléculas plasmídicas.

Se pudo corroborar que las cepas donantes que fueron exitosas en las pruebas de conjugación contenían, al menos, una molécula plasmídica mayor a los 20 Kb, variando entre una a cuatro bandas observadas.

La figura 9 y 10 se observa, entre 1 y 4 bandas, que representan las probables moléculas plasmídicas de alto peso molecular, indicando la presencia de DNA plasmídico.

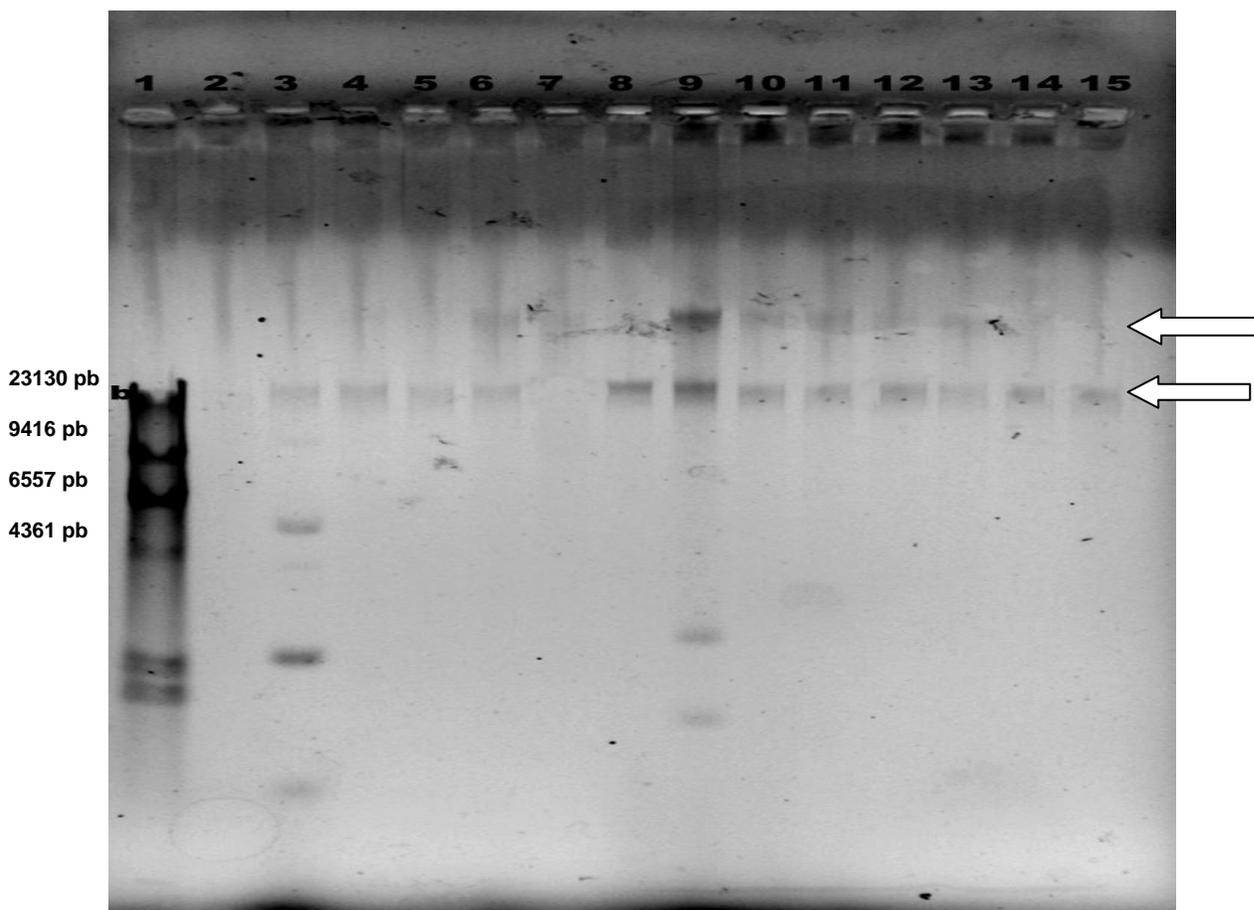


Figura 11. Registro Fotográfico del aislamiento plasmídico de las cepas transconjugantes. (Método: TENS); **Carril-Muestra:** 1-λHindIII, 2-J62-2 (Control -), 3-TU329 (Control +), 4-T3213, 5-T3372, 6-T3742, 7-T3992, 8-T4259, 9-T4375, 10-T4388, 11-T4569, 12-T4662, 13-T4715, 14-T4729, 15-T4739. Las flechas muestran la altura de las probables moléculas plasmídicas.

En la figura 11, se muestra el aislamiento del DNA plasmídico de las 11 cepas transconjugantes que se obtuvieron para el ensayo en presencia de la sal de vanadio. Ilustra que se transfirió en la mayoría de los casos una sola molécula plasmídica de alto peso

molecular, indicando la presencia de DNA plasmídico que contenía los genes que codificaron para la resistencia a la sal de metal de vanadio, además de ser estables en la cepa receptora.

Los resultados del aislamiento del DNA plasmídico, tanto por el método de lisis alcalina como por el método TENS permitieron comprobar la presencia de, al menos una molécula plasmídica de alto peso molecular en las distintas cepas estudiadas.

7.6 Expresión fenotípica de células donantes y transconjugantes.

Con el fin de evaluar y comprobar las diferencias de la expresión fenotípica entre las bacterias donantes y las bacterias transconjugantes, se realizó un registro fotográfico de colonias bacterianas de ambos tipos de microorganismos estudiados en este trabajo. En las figuras 12 y 13 se muestra el crecimiento del aislado 4259 en presencia de 200 mM de vanadato de sodio, durante 2, 4, 5, 24 y 48 horas de crecimiento.

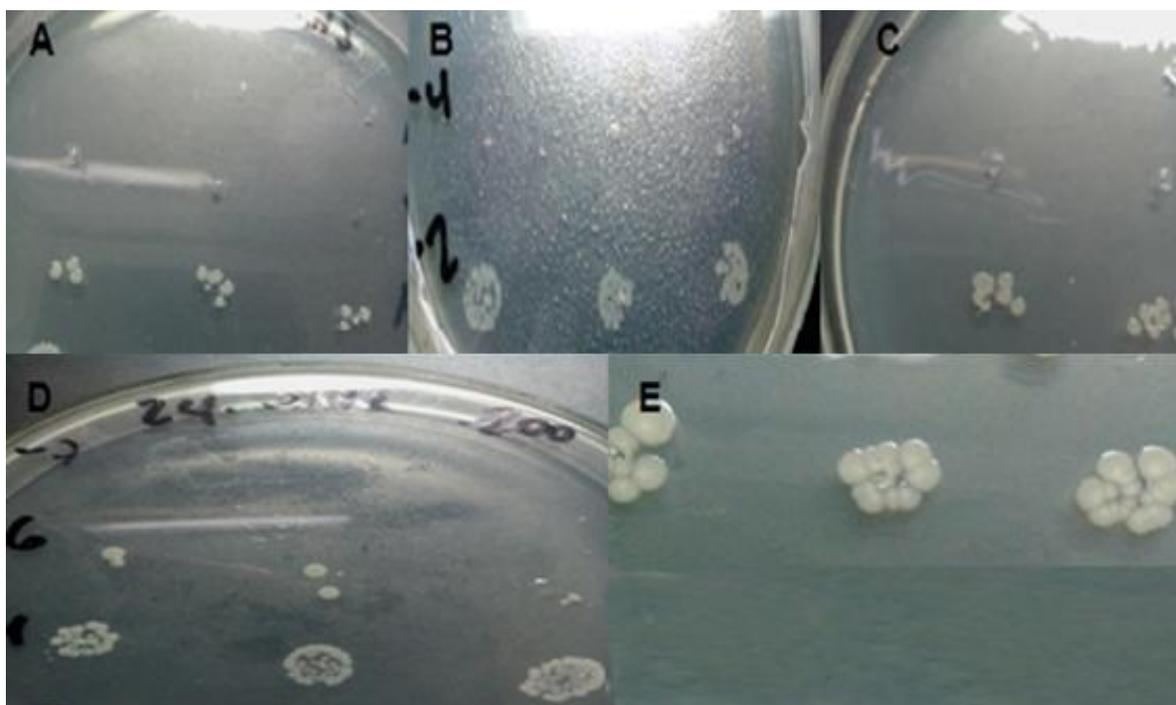


Figura 12. Registro fotográfico en las distintas horas para las fases de crecimiento para el aislado 4259: A. 2 horas B. 4 horas C. 5 horas D. 24 horas E. 48 horas.

En la Figura 13, se muestra el registro fotográfico de la transconjugante correspondiente a dicho aislado crecido a 50 mM (concentración utilizada para la selección de las transconjugantes) y a 200 mM de la sal de vanadio. Esta capacidad de crecimiento a 200 mM sugiere que efectivamente el fenotipo de resistencia fue movilizado a la población transconjugante, con todos los genes requeridos, dado que los resultados muestran que las transconjugantes pudieron crecer frente a la concentración más alta ensayada.



Figura 13. Registro fotográfico en las distintas concentraciones ensayadas de NaVO₃ para T4259: A. 50 mM B. 200 mM (ambas crecidos a 24 horas).

Se obtuvo, que al comparar las transconjugantes con las células donantes, efectivamente el fenotipo de resistencia fue movilizado a la población transconjugante, con todos los genes requeridos, para todos los aislados estudiados.

8. DISCUSIÓN

Las actividades de los microorganismos en la transformación de materia orgánica y de sustratos inorgánicos, ha sido apreciada durante mucho tiempo por los microbiólogos. Los temas claves en el marco de la geomicrobiología incluyen los ciclos biogeoquímicos de la formación de los elementos, de los minerales, y el deterioro mineral. Cada vez hay más conciencia de la importancia de la geoquímica entre los investigadores de geología, mineralogía, geoquímica y disciplinas afines dado a la importancia de los microorganismos en el papel de los ciclo biogeoquímicos (Gadd, 2010).

Las interacciones microbianas con los metales pueden tener varias implicaciones para el medio ambiente. Los microorganismos pueden jugar un papel importante en los ciclos biogeoquímicos de metales tóxicos; así como en la limpieza o remediación de ambientes contaminados. Se han reportado pruebas de una correlación entre la tolerancia a metales pesados y la resistencia a los antibióticos, un problema global que amenaza actualmente el tratamiento de las infecciones en las plantas, animales y seres humanos (Spain, 2003). Esta correlación es importante para mantener, mediante presión selectiva continua, los determinantes de resistencia a múltiples agentes antimicrobianos.

La resistencia bacteriana a los antibióticos y otros agentes antimicrobianos es un problema creciente en la sociedad actual. La resistencia a los antibióticos es adquirida por un cambio en la composición genética de una bacteria, que puede ocurrir ya sea por un mutación genética o por transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias en el medio ambiente (Spain, 2003).

Debido a que el uso actual de los antibióticos y antimicrobianos es cada vez mayor, se hacen menos útiles y puede representar un grave problema el hecho que se utilizan a menudo contra bacterias patógenas resistentes a los antibióticos. Esto acarrea como consecuencia que las enfermedades infecciosas sean cada vez más difícil y más costosas

de tratar. El principal uso de los antibióticos se da en el cuidado de la salud, así como en la agricultura y la ganadería, y esto último a su vez contribuye al creciente problema de bacterias antibiótico-resistente. Los productos tales como desinfectantes, esterilizantes, y los metales pesados utilizados en la industria y en productos para el hogar son, junto con antibióticos, la presión selectiva en el ambiente que conduce a que en los microorganismos se seleccionen y mantenga la multirresistencia que les permitirá mejorar para sobrevivir y multiplicar en estos ambientes (Baquero y col., 1998).

Muchos los microorganismos poseen distintos mecanismos que les permite soportar las condiciones de stress creadas por vivir en ambientes contaminados con antimicrobianos. Pero, en altas concentraciones, los iones de metales pesados reaccionan para formar compuestos tóxicos en las células (Nies, 1999). Para tener un efecto tóxico, sin embargo, los iones de metales pesados deben primero entrar en la célula. Debido a que algunos metales pesados son necesarios para las funciones de algunas enzimas, existen mecanismos con capacidad de captación que permiten la entrada de iones de metales en la célula.

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 alguno de ellos son elementos esenciales (en pequeñas cantidades) en los seres humanos, indiferentemente de su toxicidad (Nies, 1999).

Existen en bacterias dos sistemas de captación en general: uno es rápido y no específico, impulsado por un gradiente quimiosmótico través de la membrana celular y que no requiere ATP, y el otro es más lento y sustrato específico, impulsado por la energía de hidrólisis del ATP (Nies y Silver, 1996). Para sobrevivir en condiciones de estrés por metales pesados, las bacterias han evolucionado varios tipos de mecanismos para tolerar la absorción de estos iones de metales tóxicos. Estos mecanismos incluyen el flujo de salida de

los iones metálicos fuera de la célula, la acumulación de los iones metálicos dentro de la célula, y la reducción de los iones de metales pesados a un estado menos tóxico (Nies, 1999).

Al relacionar todo lo expuesto anteriormente no resultaría extraño que todos estos mecanismos de detoxificación, estén presentes en bacterias relacionadas con infecciones comunes que son un problema médico tales como las ITU. *E. coli* es el principal patógeno causante de ITU en pacientes ambulatorios, considerándose que representan entre el 75% y 90% de los aislados en los urocultivos de pacientes con ITU sencillas (Angiolillo, 2007). En el estudio realizado en el Laboratorio de Biología de Plásmidos, utilizando muestras provenientes de pacientes ambulatorios que presentaban ITU, y que asistieron a consulta externa en el CMDLT, se reportó que el 67% de los microorganismos causantes de infección fueron identificados como *E. coli* (Angiolillo, 2007).

Bazdikian en el 2013 reportó que frente a distintas sales de metales tóxico, entre ellas: Cloruro de Bario ($BaCl_2$), Cloruro de Estroncio ($SrCl_2$) y Molibdato de Sodio (Na_2MoO_4), el 100% de los aislados bacterianos ensayados presentaron resistencia ante todas las concentraciones ensayadas, y solo ante Cloruro de Cobalto y Sulfato de Cobre, pudo encontrar la MIC: 2 mM y 5 mM, respectivamente. La autora reportó un 76% de aislados que presentaron crecimiento en presencia de Cloruro de Cobalto y un 54% para Sulfato de Cobre (Bazdikian, 2013)

Se ha reportado que el abuso de fármacos para tratar las ITU, ha causado que se presente un ambiente selectivo sobre las poblaciones bacterianas resistentes. Esta situación nos permite suponer que también se ejerza presión selectiva para mantener otros mecanismos para la detoxificación, acompañado también de la diseminación de los genes que en alto grado, confieren multirresistencia ante distintos antimicrobianos entre los que incluyen el vanadio.

El vanadio se encuentra en pequeñas cantidades de algunas comidas como por ejemplo: la pimienta, los huevos, los aceites vegetales, los cereales, la carne bovina, los peces, las aves, los mariscos, las setas, el perejil, entre otros, en especial en aquellos alimentos cultivados en ambientes contaminados con este metal. En la actualidad se considera como un micronutriente esencial y se ha demostrado que su carencia puede provocar alteraciones en la absorción y la degradación de los carbohidratos y lípidos, el deterioro óseo, la disminución en la producción de leche materna, abortos espontáneos y problemas psicológicos (Contreras-Cadena y col., 2014).

Se ha reportado su presencia en el agua de mar como segundo metal más abundante, con una concentración cercana a 35 nM. En los seres humanos la concentración intracelular de vanadio es de 0.3 μM (Rehder, 2012).

Todo esto ha llevado a un aumento en los últimos años en las distintas investigaciones sobre este campo, dado al descubrimiento de organismos capaces de tolerar concentraciones de vanadio superiores a las normales, aunado al desarrollo de la química bioinorgánica, que ha despertado interés por entender a fondo las funciones biológicas que este elemento pueda desempeñar y las posibles aplicaciones que los compuestos de coordinación con dicho metal puedan tener en farmacología (Contreras-Cadena y col., 2014). De interés nacional cabe destacar que también se ha reportado que en el petróleo el vanadio está presente. La concentración de vanadio en el petróleo es variable y dependiendo de la fuente de donde se obtenga, el rango de la concentración de vanadio se encuentra entre 0,02 a 1180 ppm (Crans y col., 1998). El crudo venezolano se encuentra entre los que contienen una mayor concentración, presentando valores entre 282 y 1,180 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Dado a todo lo expuesto en este estudio se buscó conocer la respuesta de los microorganismos, que poseen los distintos mecanismos de detoxificación, para entender más estos mecanismos, relacionados a su vez con las bacterias que han presentado un stress antes distintos antimicrobianos como son las bacterias causantes de las distintas

infecciones, en este caso las infecciones del trato urinario. Suena extraño el utilizar bacterias que usualmente se encuentran en el organismo para probar la resistencia ante un metal tóxico, pero debido a la diseminación de los genes que confieren resistencia a distintos agentes antimicrobianos, es lógico entonces pensar, que de esta manera, pueden ser encontrados genes que confieran la resistencia ante este metal tóxico en bacterias presentes en el organismo de los humanos.

En este trabajo fue elegido el vanadio para llevar a cabo los objetivos planteados, debido a su presencia en los distintos alimentos que consumen los seres humanos, y del papel biológico que puede cumplir como nutriente traza para los seres vivos entre ellos las bacterias. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los genes que codifican proteínas que confieren resistencia a los metales pesados, como V 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 sometidos a presión selectiva de agentes antimicrobianos.

Luego de ratificar el género y especie de los aislados empleados en este estudio, fueron llevadas a cabo las pruebas para determinar el fenotipo de resistencia, en los ensayos fenotípicos fueron probadas 4 concentraciones de una sal de vanadio (vanadato de sodio, NaVO_3) los resultados mostraron que no se pudo alcanzar una MIC para NaVO_3 , encontrándose así que el 100% de los aislados estudiados pudieron crecer en presencia de 50, 75, 100 y 200 mM. Solo para la cepa control (*E. coli* K12 J62-2) fue posible hallar la MIC (50 mM) con las condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio.

Entre las razones que pueden intervenir en la determinación de la MIC, están los factores externos, principalmente el pH, que afecta 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. De esta forma no están disponibles en el

medio de cultivo *in vitro* y no afectan el crecimiento bacteriano. Otros factores son aquellos relacionados directamente con el sistema biológico, como la actividad metabólica de los microorganismos implicada en la movilidad de los elementos tóxicos (<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6978/02introducci%C3%B3n.pdf?sequence=2>).

Los cambios de pH pueden influir fuertemente en la adsorción o liberación de cationes (desorción) por las sustancias orgánicas. También el potencial redox de un ambiente influye en los fenómenos de especiación metálica, los equilibrios redox están controlados por electrones libres que a su vez viene definido por los potenciales redox (E_h) (M_V). Los valores altos de E_h está asociado a fenómenos oxidantes, mientras que valores bajos del mismo, los hacen reductores. (Tomado de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6978/02introducci%C3%B3n.pdf?sequence=2>)

En un estudio realizado por Bell y colaboradores en 2004, evaluaron la tolerancia a vanadio de bacterias aisladas de suelos contaminados por petróleo en Rusia y Arabia Saudí. Los autores utilizaron 4 sales de vanadio: pentaóxido de vanadio (V_2O_5), sulfato de vanadilo ($VOSO_4$), ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) y metavanadato de sodio ($NaVO_3$). Diseñaron y compararon protocolos para determinar efectos del buffer en los medios de cultivos suplementados con las distintas sales de vanadio. Con los resultados de ese estudio determinaron la creación de protocolos para la estabilización del pH en medios de cultivos que contenían las distintas sales de vanadio, demostrando que aunque las sales de vanadio poseen efectos tóxicos, en los ensayos de determinación de la MIC, muchos de estos efectos están relacionados principalmente por mantener un pH que no tenga variación, y es inherente a la toxicidad del metal, que hay que distinguir estos efectos tanto de pH, como de los compuestos de vanadio. Concluyeron entonces que los efectos de las sales de vanadio son influenciados por el pH del medio de cultivo (Bell y col., 2004).

Las interacciones entre las bacterias y los metales en muchos casos son bien conocidas y pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana ó intracelularmente. A nivel extracelular, se ha determinado: 1) el papel de los microorganismos en la movilización e inmovilización de metales y 2) la secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad por estos elementos (sideróforos) (Suarez y Reyes, 2002).

La interacción inicial entre los microorganismos y los metales, ocurre por atracción electrostática entre los iones cargados en solución y los grupos funcionales de la superficie celular microbiana. En las bacterias Gram-positivas, que toman el color del cristal violeta durante la tinción de Gram (Beveridge, 1990; Madigan y col., 1997), la pared celular constituye el primer frente de interacción con las moléculas presentes en el ambiente. En los medios de cultivo apropiados para el crecimiento bacteriano, las especies Gram-positivas presentan una pared celular cargada negativamente, aunque también contiene cargas positivas en menor número.

Los cationes necesarios para las funciones proteicas o la actividad enzimática deben atravesar la pared celular de las bacterias Gram-positivas para alcanzar sus sitios de unión cerca de la membrana o en el citoplasma. En las bacterias Gram-negativas, que toman la coloración rosada de la safranina durante la tinción de Gram (Beveridge, 1999; Madigan y col., 1997), la membrana externa es capaz de unir un amplio rango de iones metálicos. Los cationes al parecer son accesorios importantes que estabilizan la arquitectura molecular de la membrana. También se supone que la unión a iones metálicos reduce las cargas repulsivas entre los constituyentes anicónicos de moléculas de lipopolisacáridos y de proteínas adyacentes.

En 2013, Kamika y Momba, evaluaron la biorremediación de V^{5+} y Ni^{2+} en las aguas residuales por una especie bacteriana endógena. Estas especies bacterianas fueron aisladas de agua de una mina. Los aislados toleraron los iones V^{5+} y Ni^{2+} , por separado, a

concentraciones que oscilan entre 650 a 700 mg/L y 250 y 300 mg/L, respectivamente. Este estudio reveló que los efluentes de agua de la mina altamente contaminados y tóxicos son reservorio de especies microbianas novedosas que adecuadamente se pueden utilizar para la eliminación de metales en los efluentes altamente contaminados (Kamuka y Momba, 2013).

Esta forma de eliminar y concentrar los metales tóxicos, por los microorganismos esta relacionado con varios mecanismos ante la presencia de metales pesados (como bombas eflujos, reacciones redox entre otras) y también muy relacionados con el uso como aceptor final de electrones en la respiración anaeróbica (Shirdam y col., 2006).

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 resistencia hacia metales pesados presentes en cepas aisladas de distintos ambientes, tanto de terrestres y acuáticos. En el 2005 se publica un trabajo sobre 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 de cromo 40, 42% para esta misma concentración. Otro trabajo, de los mismos investigadores, se centró en la evaluación se centro 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; 85% para cadmio y cromo, y un 75% de cepas resistentes al mercurio (Bracho y col., 2005).

En nuestro trabajo, las muestras no fueron aisladas de ambientes naturales, ni acuáticos ni terrestres, son muestras obtenidas a partir de personas con infecciones del tracto urinario. Los resultados nos permiten señalar que se encontró resistencia hacia la sal de vanadio, en este caso vanadato de sodio (VaNO₃); en los 100% de los aislados analizados, en las concentraciones ensayadas.

Los ensayos estándares que se realizan para evaluar la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos son mediante la estimación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cual evalúa la sensibilidad bacteriana en su forma de crecimiento libre. Sin embargo, se conoce que el impacto de los metales sobre el metabolismo bacteriano depende del estado de crecimiento (*Haferburg y Kothe, 2007*).

Se ha estudiado la supervivencia bacteriana, en presencia de compuestos tóxicos, y esta es dependiente de diversos mecanismos de resistencia. Estos mecanismos de resistencia permiten que el crecimiento bacteriano ocurra en altas concentraciones de los antimicrobianos, incluidos los metales pesados. En contraste con los mecanismos de resistencia, algunas células son capaces de sobrevivir a la acción de los metales sin expresar o emplear algún mecanismo, manteniéndose inactivas. Inicialmente, estas células persistentes han sido investigadas en cultivos, y se han evaluado en su forma de crecimiento libre (*Perrin y col., 2009*).

Las sales de V inhiben el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* cuando el medio se encuentra limitado por Fe. El V causa una prolongación de la fase latencia, sin afectar la fase logarítmica en aquellos medios con exceso de Fe. Contrariamente a lo que se observa en medios con limitaciones de Fe, en la cual la fase de latencia está menos afectada por la presencia de V en el medio, pero la tasa de crecimiento se ve reducida. Estas observaciones sugieren que el V puede afectar diferentes funciones dependiendo de la cantidad de Fe contenido en la célula (*Baysse y col., 2000*).

En cultivos de *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa*, la adición de V causa un incremento en la fase logarítmica, aunque la presencia de Fe en el medio incrementa la sensibilidad a V (*Denayer y col., 2006*). Sin embargo, durante las diversas fases del crecimiento de *Enterobacter cloacae*, diversas concentraciones de V ejercen una disminución de la biomasa bacteriana una vez que las células alcanzan la fase logarítmica tardía o estacionaria temprana del crecimiento. Esta capacidad de reducir V en diferentes

fases del crecimiento, parecieran indicar que la reducción del V depende de la fase de crecimiento, lo cual se observa frecuentemente en las reacciones que involucran metaloreductasas (Marwijk y col., 2009).

En este trabajo se muestra el efecto de vanadio en los aislados de estudio, ante diferentes concentraciones, todos los aislados fueron capaces de crecer, sin embargo en base a lo antes expuesto, el crecimiento de forma libre de una célula bacteriana, se compone por cada una de las fases que están involucradas en el crecimiento. Al comparar las fases analizadas en este trabajo, la fase exponencial temprana y la fase estacionaria, pudieron encontrarse diferentes respuestas ante los tratamientos ensayados. Estos tratamientos promueven entonces respuestas distintas, lo cual lleva a pensar y como las células bacterianas pueden responder al mismo tratamiento a lo largo de la cinética de crecimiento.

Se obtuvieron como resultado, los valores que permitieron elaborar las distintas graficas relacionadas con la cinética de crecimiento, mostrando respuestas diferentes a cada fase. Al comparar las concentraciones ensayadas, con respecto a la cinética de crecimiento de cada aislado sin presencia del metal, pueda entenderse más acerca de la interacción metal-microbiota.

El crecimiento de forma libre en ausencia de vanadio, para el tiempo 0 horas tenía un promedio de U.F.C de 10^6 cel/mL, alcanzando en la fase estacionaria un promedio de 10^9 cel/mL.

Al colocar las bacterias a crecer en concentraciones crecientes de vanadio, se observó entonces, una disminución del Ln(U.F.C.), y en cada fase había un comportamiento distinto, que permitió el crecimiento de las bacterias. Esto sugiere mecanismos distintos de resistencia, pero que permite a las células permanecer refractarias ante el efecto bacteriostático de la sal de metal. La inhibición del crecimiento no fue posible si no hasta una concentración de 200 mM de la sal de vanadio, que fue la mayor concentración ensayada, observándose un cambio drástico en el crecimiento en todos los aislados bacterianos,

alcanzándose valores de U.F.C del orden de 10^6 cel/mL a tiempo 0 horas, y manteniendo el valor de 10^6 cel/mL, a lo largo del tiempo, evidenciando así el efecto que ocasiona el aumento de la concentración.

En el 2011, Islas y Bojórquez, determinaron el potencial biotecnológico de bacterias reductoras de Cr+6, y encontraron que las bacterias reducían el cromo a Cr+3 , habiendo una mayor reducción a las 168 horas de crecimiento, hallando a su vez una resistencia mayor para este tiempo (fase estacionaria). Al comparar con otros estudios, este comportamiento varia ampliamente, ya que se ha reportado la reducción una concentración de Cr+6 en el sobrenadante entre 80-98 %, en una fase estacionaria entre 24-48 h (Donmez y Kocberber 2004, Srinath y col.,2002).

Se han reportado diferentes comportamientos, que se encuentra relacionado con la fisiología, metabolismo y morfología celular en cada fase del crecimiento y en cada tipo celular. En relación a estas poblaciones en el año 2002, Makinoshima y colaboradores realizaron un estudio acerca de las diferentes poblaciones en distintos estados de crecimiento de *E. coli*. Los autores realizaron centrifugación de una fracción de células de *E. coli* en un gradiente de Percoll, reportando para la fase exponencial al menos 5 bandas discretas de baja densidad, y en cambio para la fase estacionaria los cultivos formaban al menos 10 bandas de altas densidades. Esto se relaciona con lo heterogéneo que puede ser un cultivo, pudiéndose encontrar al menos 10 sub-poblaciones celulares.

Al comparar las características de cada fase, se observa que las condiciones pueden jugar un papel importante en la resistencia y la tolerancia frente a metales tóxicos. Para la fase exponencial o logarítmica, en la cual se expresa el mayor crecimiento o incremento logarítmico, la reproducción celular alcanza una actividad máxima durante este período y su tiempo de generación llega a un mínimo constante. Es una consecuencia del hecho que cada célula se divide para formar dos células, cada una de las cuales también se divide para formar dos células más y así sucesivamente. Durante esta fase los microorganismos

consumen los nutrientes a velocidad máxima (Hagen., 2010). También hay una mayor tasa de síntesis de ADN, ARN y proteínas, existe una mayor actividad metabólica, lo cual va acompañado de todos los mecanismos ATP dependientes que pueden estar funcionados para la detoxificación ante metales pesados.

En la fase estacionaria, ocurren gran cantidad de cambios asociados a la fisiología y morfología bacteriana. En esta fase disminuye el volumen celular y las bacterias se redondean, disminuye la tasa global de síntesis de DNA, RNA y proteínas, aumenta la degradación de proteínas, se reorganiza el metabolismo general y se acumulan compuestos de reserva (polifosfato y glucógeno) y de osmoprotección (trehalosa y glicina betaina). En el caso de los cultivos de fase estacionaria de *E. coli* en medio de cultivo LB, la cuenta viable y el genotipo de las células se mantiene estable por 2 a 3 días. Posteriormente se presenta muerte celular y el crecimiento lento de una subpoblación de células mutantes que predomina en el cultivo a partir del día 10. Estas mutantes denominadas GASP (**G**rowth **A**dvantage in **S**tationary **P**hase) muestran una mayor capacidad para sobrevivir el ayuno (Ramírez y col., 2005).

Al comenzar la generación de subpoblaciones celulares diferentes en los cultivos en fase estacionaria posiblemente representa una estrategia adicional para asegurar la posibilidad que una fracción de células pueda reiniciar el ciclo celular en respuesta a la presencia de nutrientes en el medio. Cuando la densidad celular es alta y los nutrientes se agotan, se alcanza un umbral que induce la inhibición del inicio de la replicación de las células del cultivo. La regulación genética dependiente de la densidad celular e inducida por un factor extracelular se denomina “quorum sensing” o censo del quorum. Esto implica que las células en fase estacionaria son incapaces de reiniciar la replicación (Withers y Nordström, 1998).

En nuestro estudio se calcularon 2 parámetros microbiológicos importantes para el análisis de los comportamientos de cada fase del crecimiento: la fracción de supervivencia y

el logaritmo de reducción de la viabilidad, los cuales representan herramientas muy útiles para comparar, el efecto del vanadio a las distintas concentraciones ensayadas con respecto al crecimiento control.

Para la fracción de supervivencia que relaciona las células tratadas con respecto al control, este valor nos indica cuantas células sobreviven frente a un tratamiento específico, para este estudio, los tratamientos fueron las distintas concentraciones de la sal de vanadio. Así se observó en los resultados como la fracción de supervivencia para las concentraciones 50 y 100 mM, hubo más sobrevivientes a 24 horas de crecimiento, que frente a 200 mM, donde se observó un mayor número de sobrevivientes a las 2 horas de crecimiento. De esta misma manera al compararse con las graficas del logaritmo de reducción de la viabilidad, que es el término matemático que se utiliza para mostrar el número relativo de microorganismos vivos que fueron eliminados de una superficie mediante la desinfección o limpieza, en este caso frente actividad toxica del Vanadio. Se obtuvo un mayor número de reducción en los tiempos 2, 4 y 5 horas de crecimiento para todos los aislados a 50 y 100 mM, y para la concentración de 200 mM se obtuvo una menor reducción de los microorganismos, muy distinguible para las 2 horas de crecimiento en todos los aislados.

En este estudio las bacterias presentan mayor crecimiento en la fase estacionaria del crecimiento ante concentraciones menores del metal, esto puede ser visto como una menor disponibilidad del metal para su uso por las células presentes en un cultivo, que va acompañado con los cambios morfológicos de esta fase. Mientras que hay una mayor resistencia para las concentraciones más altas en la fase exponencial temprana. Se podría sugerir que la resistencia para la fase exponencial, la cual se caracteriza por ser metabólicamente más activas las células, podría estar operando un mecanismo de expulsión activa, que actúan expulsando fuera de las células el metal tóxico. Alternativamente también

puede sugerir un mecanismo de actividad metabólica de oxido reducción que estarían convirtiendo este metal a una especie menos toxica de vanadio.

En la fase estacionaria, esta resistencia está más relacionada a la disminución del metabolismo y a los cambios estructurales, fisiológicos y morfológicos dentro y fuera de las células que permite el crecimiento y el mantenimiento de la viabilidad celular para los aislados estudiados al no permitir la entrada de este metal. O estos aislados utilizan el vanadio en una respiración anaeróbica como aceptor final de electrones como ocurre en un amplio grupo de microorganismos, permitiendo el desarrollo y crecimiento de las células

Suárez y Reyes en el 2002, describen la bioabsorción como una propiedad de la biomasa, en particular la microbiana, para inmovilizar y concentrar metales en soluciones acuosas. Los componentes de la superficie celular que actúan como bioabsorbentes son polímeros estructurales y extracelulares con un alto contenido de grupos funcionales (polianiones), que interactúan con los metales, atrapándolos dentro de su estructura.

Kafilzadeh y colaboradores en el 2012, evaluaron la resistencia a plomo por *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Corynebacterium sp*, *Staphylococcus sp* y *E. coli.*, encontrando que las bacterias Gram positivas presentaron mayor crecimiento que el crecimiento observado de bacterias Gram negativas en fase logarítmica, y además eran capaces de eliminar el plomo, observando el resultado obtenido por el espectrofotómetro de absorción atómica, con valores de: *Bacillus sp*, 89,66%, *Pseudomonas sp*, 87,97%, *Corynebacterium sp* 86,64%, *Staphylococcus sp* 64,82 % y *E. coli* con 60,35%. También observaron que en su investigación la bacteria resistente identificada como *Bacillus sp*, crecía mejor frente a concentraciones altas de plomo, y que el crecimiento de esta bacteria incrementaba por la adición de plomo al medio de cultivo observado en el crecimiento de la mitad de la fase logarítmica. Encontraron que existe una relación directa entre el aumento de la concentración el medio de cultivo con el aumento del porcentaje de eliminación por parte de las bacterias resistentes.

En el 2006, Shirdam y colaboradores, en su estudio para la acumulación de cadmio, níquel y vanadio, en distintas cepas bacterianas marinas, encontraron mayor resistencia y acumulación de estos 3 metales, en la fase estacionaria de crecimiento (Shirdam y col., 2006). Todos estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos para este trabajo.

Otro estudio relacionado con los resultados obtenidos, es el realizado por Teitzel y Parsek en el 2003, quienes evaluaron los efectos de los metales pesados en células de *Pseudomonas aeruginosa* creciendo en forma libre en fase logarítmica y en fase estacionaria, reportando que en la fase logarítmica las células presentan mayor resistencia ante los metales tóxicos, relacionando esto a la actividad de bombas eflujo de los metales pesados ya que es un mecanismo que requiere ATP el cuál abunda en la células activas metabólicamente (Teitzel y Parsek, 2003).

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.

La presencia de plásmidos transmisibles confiere a las bacterias propiedades que contemplan su capacidad para colonizar ambientes adversos, favorece el intercambio genético intracelular, y garantiza la diseminación horizontal de genes de resistencia antes distintos antimicrobianos.

Es debido a este uso indiscriminado de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades en la población, que ha causado el desarrollo de resistencia microbiana a estos compuestos, ocasionado un efecto colateral en los microorganismos, debido a que ahora seleccionan y expresan la resistencia a los metales pesados, como consecuencia de

la presencia de genes que confieren resistencia y que pueden hallarse en un mismo plásmido.

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 y cobre (Harnett y Gyles, 1984).

En trabajos previos del laboratorio, se realizaron pruebas de conjugación con los aislados analizados 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 resistentes a ampicilina y gentamicina, fueron capaces de transferir los genes de resistencia ante dichos antibióticos (Angiolillo, 2007).

En el trabajo de Bazdikian en el 2010, reportó 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 fenotipos de resistencia ante CoCl_2 2mM y transfirieron mediante el proceso de conjugación los genes de resistencia ante Co; 17 presentaron resistencia a CuSO_4 mM y fueron capaces de transferir genes de resistencia ante Cu, y los 6 aislados restantes presentaron resistencia para ambas sales a dichas concentraciones (Bazdikian, 2013).

En el presente trabajo se estudiaron 12 aislados, y de todos los ensayados para el proceso de conjugación, solo 11 fueron capaces de transferir los genes que codifican para la resistencia hacia V. Los 12 aislados presentaron fenotipo de resistencia para 200 mM de NaVO_3 , y transfirieron mediante el proceso de conjugación dichos genes, obteniendo 11 cepas transconjugantes que presentaron el mismo fenotipo de resistencia frente a 200 mM de NaVO_3 . Los resultados obtenidos indican que los 12 aislados que presentaron genes que

codifican resistencia para V, el 100% de los aislados ensayados en este trabajo portan los genes que codifican las proteínas de la maquinaria necesaria para llevar a cabo dicho proceso, mediante los sistemas T4SS.

Esto quedó evidenciado en los resultados obtenidos para el aislamiento de las moléculas de ADN plasmídico que estaban presentes en los diferentes aislados. Al comparar los resultados obtenidos por los métodos empleados, con las células donantes, se observó moléculas de ADN plasmídico de gran tamaño por encima de los 20 Kb, detectando para cada caso de 1 a 4 bandas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Angiolillo en el 2007, encontrando de 1 a 10 bandas para las cepas donantes que presentaron resistencia a distintos antibióticos. Para el caso del análisis de las células transconjugantes se evidencia por electroforesis que al menos una molécula de ADN plasmídico se transfirió y por deducción debe contener los genes de resistencia a vanadio.

Los valores obtenidos para la frecuencia de transferencia por conjugación de los genes que confieren resistencia a V oscilaron entre $8,46 \times 10^{-4}$ y 1×10^{-3} células transconjugantes/células donantes. Estos valores entran en el rango de plásmidos de frecuencia de transferencia relativamente alta, en comparación con los rangos obtenidos por Bazdikian con valores que oscilaron entre $2,06 \times 10^{-6}$ a $8,4 \times 10^{-2}$ para Co, y $3,03 \times 10^{-6}$ a $6,52 \times 10^{-3}$ células transconjugantes/células donantes.

Otro trabajo que reportó valores altos de frecuencia de transferencia es realizado por Calderón y colaboradores en el 2013, quienes trabajaron con cepas bacterianas resistentes al mercurio y aisladas a partir de una laguna localizada en El Callao (Estado Bolívar, Venezuela), la cual contiene una concentración alta de Hg soluble. Estas cepas fueron capaces de transferir *in vitro* marcadores de resistencia a metales y antibióticos a cepas potencialmente patógenas para el hombre y animales (ej. *Escherichia coli* y *Pseudomonas*

aeruginosa). Las frecuencias de transferencia variaron entre $1,2 \times 10^{-6}$ y $5,5 \times 10^{-7}$ células transconjugantes/células receptora (Calderón y col., 2013).

De las 29 transconjugantes obtenidos en el trabajo de Bazdikian en el 2013, 5 de las donantes coinciden con las donantes de las cuales se obtuvieron transconjugantes en nuestro trabajo (T3372, T4388, T4715, T4729 Y T4739). Y de las 16 transconjugantes obtenidos por Angiolillo en el 2007, 3 de las donantes utilizadas coinciden con las utilizadas en este trabajo (T4375, T4569 Y T4662). Todos estos resultados en conjunto sugieren que estas cepas poseen plásmidos portadores de multideterminantes de resistencia, convirtiéndose así en cepas multirresistentes ante una gran cantidad de antimicrobianos, tales como antibióticos y metales tóxicos.

Según los resultados obtenidos del fenotipo de resistencia frente a 200 mM de la sal de vanadio, en las distintas fases de crecimiento, sugieren una gran capacidad de estos aislados bacterianos de poder sobrevivir frente a este metal tóxico, así como ante otros antimicrobianos, obteniendo bacterias multirresistentes que pudieran representar un riesgo potencial en el campo de salud pública, y hacer más difícil y costosos los tratamientos de infecciones usuales de la población. Otro punto importante de los resultados presentados es en relación a la identificación de aquellos microorganismos resistentes, así como el conocimiento de los mecanismos involucrados de dichas resistencias, los cuales pueden ser utilizados de forma adecuada, y podrían emplearse en procesos de biorremediación de áreas contaminadas (Bazdikian, 2013).

Es importante resaltar que no solo los microorganismos se ven afectados por ecosistemas altamente contaminados, usualmente por las fuentes antropogénicas que son causante de la acumulación de distintos elementos contaminante a los distintos ambientes. También la población humana puede verse afectada. No es solo la capacidad bacteriana para lograr sobrevivir ante situaciones adversas y estrés ocasionado por grandes contaminantes, debe

existir un control sobre las actividades que contribuyen a la acumulación de estos elementos contaminantes, ya que a diario aumenta el número de bacterias multirresistentes.

Aunque en este trabajo se ha mostrado el vanadio como un metal tóxico, también existe una gran cantidad de estudios que apuntan al descubrimiento de su importancia biológica debido a que, diariamente consumimos alrededor de 1 µg de V proveniente del aire, 11 a 30 µg provenientes de los alimentos y de 1 a 30 µg/L provenientes del agua bebida, lo que hace un total de 10 a 70 µg/día. Los hongos, mariscos, semillas de eneldo, perejil y pimienta negra son ricos en este elemento. En el agua de bebida los niveles de V son variables (de 0,2 a más de 100 µg/l) y dependen de la localización geográfica.

Los complejos de vanadio poseen una amplia gama de características que les permiten ser desde micronutrientes esenciales hasta agentes tóxicos. El descubrimiento de seres vivos con grandes cantidades de vanadio (como los tunicados o el hongo *Amanita muscaria*) han fomentado el interés por conocer el papel que este elemento desempeña en dichos organismos. También se han llevado a cabo estudios para determinar su actividad biológica, encontrando así propiedades anticancerígenas, antiobesidad, antimicrobiales, insulinomiméticas (que imiten la función de la insulina), etc., que podrían ser empleados en el tratamiento de diversos padecimientos (Contreras y col. 2014).

El vanadio ha demostrado tener efectos biológicos notables, ya sea como un agente tóxico o farmacológico. Sin embargo, es necesario conocer más acerca de los mecanismos de acción biológica de este elemento para determinar tanto los riesgos a su exposición como sus posibles usos farmacológicos en beneficio humano (García, 2006).

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 transferidos a otras células, pasando no solamente los genes de resistencia ante una antibiótico, si no ante múltiples antimicrobianos, entre los que se incluyen los desinfectantes y los metales pesados.

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 humanos, afectaría seriamente su salud y su calidad de vida. Por esta razón el recurso más eficaz para combatir las infecciones continúa siendo el uso adecuado y selectivo de los agentes antimicrobianos.

9. CONCLUSIONES

- Los 12 aislados bacterianos ensayados resultaron resistentes a NaVO_3 200 mM.
- No se pudo determinar la MIC, alcanzándose crecimiento en presencia de $V \leq 200$ mM.
- El 91,6% de las cepas donantes de *E. coli*, resistentes a vanadio, fueron capaces de transferir los genes que codifican para la resistencia a V por medio del proceso de conjugación bacteriana.
- La mayor frecuencia de transferencia de genes de resistencia a V, en el proceso de conjugación fue de $1,87 \times 10^{-3}$ células transconjugantes/ células donantes. El menor valor de frecuencia fue de $8,46 \times 10^{-4}$.
- Todas las cepas, tanto donantes como transconjugantes, analizadas contenían, al menos, una molécula plasmídica de alto peso molecular (mayor a 20 Kb).
- Los plásmidos transferidos a las cepas transconjugantes, deben poseer todos los genes de resistencia para V, ya que las células transconjugantes presentaron el mismo fenotipo de las donantes.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso G., Narváez P., Pedroza R., Rodríguez V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **25:29-34.**

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

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

Baquero, F., Negri, MC., Morosini, MI., and Blazquez, J. 1998. Antibiotic-selective environments. *Clinical Infectious Diseases* **27: S5-S11.**

Baysse C., Vos D., Naudet Y., Vandermonde A., Ochsner U., Meyer J., Budzikiewicz H., y colaboradores. 2000. Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **146:2425-2434.**

Bazdikian E. 2013. Prevalencia y transmisibilidad de determinantes de resistencia a metales pesados en *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones en el tracto Urinario. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Bell J., Philp J., Kuyakina M., Ivshina I., Dunbar S., Cunningham C., Anderson P. 2004. Methods evaluating vanadium tolerance in bacteria isolated from crude oil contaminated land. *Jour. of Microbiol Methods.* **58: 87– 100**

Beveridge T. 1990. Mechanism of Gram variability in select bacteria. *J. Bacteriol.* **172: 1609-1620.**

Brock, Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2002. Biología de los microorganismos Décima Edición. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, S.A., Mexico.

Calderón W., Ball M., Botello W. y Yarzabal L. 20013. Horizontal transfer of heavy metal and antibiotic-resistance markers between indigenous bacteria, colonizing mercury contaminated tailing ponds in southern Venezuela, and human pathogens. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* **33:110-115**

Cervantes C. 2000. Mecanismos de expulsión de metales pesados en bacterias *Bol. Educ. Bioquim.* **19(1):24-31.**

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

Chalbaud A. 2010. Caracterización epidemiológica de bacterias causantes de infecciones nosocomiales. Tesis Doctoral. Universidad central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Chalraud A., Guevara Y., Redondo C., Chivico M., Portale P., Silva M., Angiolillo G. y Alonso G. 2012. Estudio de las propiedades codificadas por plásmidos en aislados bacterianos y su epidemiología. *Men.Inst. Biol. Exp.* **6:37-40.**

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. Infec. Microbiol.* **27(4):114-117.**

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

Contreras D., Gómez C. Rangel M., Ruiz A., Martínez P. y Barba N. 2014. La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educ. quím.*, **25(E1), 245-253.**

Crans D., Amin, S.S., Keramidas, A. 1998. Chemistry of relevance to vanadium in the environment. In: Nriagu, J.O. (Ed.), Vanadium in the Environment: Part 1. Chemistry and Biochemistry. Wiley, Canada :**73-96.**

Donmez G. y Kocberber N. 2004. Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. *Enz. Microb. Tech.* **36:700-705.**

Farmer JJ III. 1995. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Manual of clinical microbiology. 6ª ed. Washington, D.C. ASM Press **1995: 440.**

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

García G. 2006. El vanadio, un elemento ambiguo. *Acta Toxicol. Argent.* **14 (2): 32-36**

González G., Mella S., Zemelman R., Bello H., Domínguez M. 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antimicrobianos. *Rev. Méd. Chile.* **132: 619-626.**

Griffiths A.J.F. Miller, J. F., Suzuki D.T., Lewontin R. C. Gelbart W. M. 2002 Genética. Séptima edición. Editorial Interamericana- McGraw Hill. Madrid, España.

Guzmán M. 2006. Caracterización de los determinantes de codificación β -lactamasa de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*; (Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patrón de Alcalá"). Tesis Doctoral en Biología Celular. Facultad de Ciencias, UCV.

Hagen S. J. 2010. Exponential growth of bacteria: Constant multiplication through division. *Am. J. Phys.* **78**: 1290-1296.

Harnett N. M., y Gyles C. L. 1984. Resistence 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.

Islas M., Bojórquez R. 2011. Bacterias reductoras y su potencial biotecnológico. *Rev. Int. Contam. Ambie.* **27(3)** 231-239.

Ivics Z, Li MA, Mátés L, Boeke JD, Nagy A, Bradley A, Izsvák Z. 2009. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat. Methods* **6(6)**:415-22.

Jehl F., Chomarar M., Gérard A., Baquero F., Cantón R. 2004 Del antibiograma a la prescripción. Editions bioMérieux, S.A. Segunda Edición. Francia.

Kafilzadeh F., Afrough R., Johari H., Tahery Y. 2012. Range determination for resistance/tolerance and growth kinetic of indigenous bacteria isolated from lead contaminated soils near gas stations (Iran). *European Jour. of Exp. Bio.* **2 (1)**:62-69

Kamima I., Momba M. 2013. Bioremediation of V⁵⁺ and Ni²⁺ by indigenous marinobacter *goseongensis* isolated from South African Vanadium mine waste. Wolkersdorfer Brow and Figueroa editors. **Golden CO; USA: 613-618.**

Koneman E. W., Allen S. D., Dowel V. R., Sommers H. M. 1983. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana Buenos Aires, Argentina.

Madigan J, Martinko B, Parker J. 1997. *Biology of Microorgans.* . Prentice Hall, New Jersey. **986 pp.**

Makinoshima H., Nishimura A. y Ishihama A. 2002. Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Molec. Microbiol.* **43(2)**, 269-279.

Marrero-Coto J., Díaz-Valdivia A., Coto-Pérez O. 2010. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Rev. Ceni. Ciens. Bio.* **41(1)**:67-78.

Marwijk V., Opperman D. 2009. Reduction of vanadium (V) by *Enterobacter cloacae* EV-SA01 isolated from a South African deep gold mine. *Biotechnol Lett* **31**:845–849.

Negróni M. 2009. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina.

Nies D. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 730-750.

Norwood D. E., Gilmour A. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 512-520.

Perrin C., Briandet R., Jubelin G., Lejeune P., Mandrand M., Rodrigue A., Dorel C. 2009. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Appl Environ Microbiol.* 75(6):1723-1733.

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.

Ramírez S. J; Contreras G.; Gómez C. 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47(3)(4)**:92-101.

Rehder, D. 2012. The potentiality of vanadium in medicinal applications, *Future Medicinal Chemistry*, **4(14)**, 1823-1837.

Reyes R., Suárez P. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia Para el ambiente. *Interciencia* **27(4)**:160-164.

Rodríguez G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *E coli*. *Salud Pública México.* **44(5)**:464-475.

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.

Srinath T., Verma T., Ramteke P. y Garg S. 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* **48**:427-435.

Stocker H., Seager S. 1981. Química Ambiental. Contaminación del Aire y del Agua. Editorial Blume, Barcelona, España, 320 pp.

Teitzel M. G. y Parsek M. R. 2003. Heavy metal resistance of Biofilm and planktonic. *Pseudomonas aeruginosa.* *Appl. Environ. Microbiol.* **69(4)**:2313-2320.

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

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

Villarroel 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.

Walker S. 2000. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. Tercera Edición. México.

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

Withers, H. L. & K. Nordström. 1998. Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15694-15699

Consultas en línea:

Bastardo Y., Pedrique M. 2001. Producción de energía en los microorganismos. Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia. (Universidad Universidad Central de Venezuela) Caracas, Venezuela. Disponible [en línea]: <http://www.microbiologiabasica.files.wordpress.com/2008/04/clasificación-bacteriana.pdf> (Consultado el 24/01/2014).

Bracho M., Querales L., Caraballo L., Botero L. 2005. Resistencia a metales pesados de *Escherichia coli* en agua potable. Disponible [en línea]: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/vitaeVeinticinco/Jornadamicrobiología/ArchivosHTML/MB-010.pdf> (Consultado 25/01/2014).

Cires M., Freijoso E., Vergara E., Machado O., Alfonso I., Salas L. y col. 2002. Guía para la práctica clínica en infecciones del tracto urinario. *Rev. Cuba. Med. Gene. Inte.* Disponible [en línea]: <http://www.bvs.sld.cu.htm> (Consultado: 12/02/2014)

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: 20/01/2014).

Guerrero-Fdez J. Infección de orina: Cistitis y pielonefritis. 2001. Disponible [en línea] en : http://www.webpediatrica.com/infopadres/pdf/infeccion_orina.pdf (Consultado: 15/05/2014

Grau S. 2002. Infección urinaria baja. Disponible [en línea] <http://www.zambon.es> (Consultado: 15/01/2014)

López G. A. 2010-2011. Genética Bacteriana. Disponible [en línea] en: <http://www.microral.wikispaces.com/3.+Gen%C3%A9tica+bacteriana>. (Consultado 07/02/2014).

Martínez D. C., Cambronero J. A., Senovilla P. J. 1997. Fisiopatología de la infección urinaria. *Clinicas Urologicas de la Complutense* 5, 51-64. Disponible [en línea]: <http://revistas.ucm.es/index.php/CLUR/article/viewFile/CLUR9797110051A/1459> (Consultado: 15/05/2014).

Vullo L. D. 2003. Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Rev. Quim. Virtual* 2(3) Disponible [en línea]: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm> (Consultado: 20/06/2014)

Consultas en línea sin autor:

<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/v.htm> (Consultado 20/01/2014)

<http://salud.com.es/la-bacteria-e-coli.html> (Consultado 20/01/2014)

<http://vidabidet.com/padecimientos/infecciones-urinarias-htm%E2%80%8E/>
(Consultado 20/01/2014)

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
(Consultado 18/06/2014)

<http://medmol.es/revisiones/60/> (Consultado 26/06/2014).

http://bioanatomiaappu.blogspot.com/2013_04_01_archive.html (Consultado: 20/06/2014)