



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

# Estudio del fenotipo de la resistencia al cloruro de cadmio y al cloruro de zinc en aislados bacterianos Gram-negativos

## **TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Ariadna del Valle Morales Barreto** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

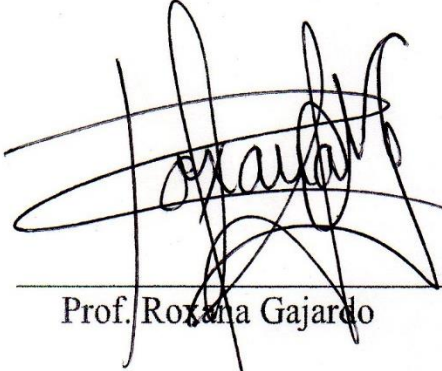
Tutor: Lcda. Victoria Navas


CARACAS, VENEZUELA  
Octubre, 2019


**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DEL (A) Br. ARIADNA MORALES**

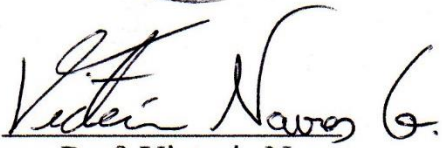
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Ariadna Morales, C.I: 24635101, titulado “**Estudio del fenotipo de la resistencia al cloruro de cadmio y al cloruro de zinc en aislados bacterianos Gram-negativos**”, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 23 días del mes de Octubre del año 2019, dejando constar que la Prof. Victoria Navas actuó como coordinadora del jurado examinador.

  
Prof. Roxana Gajardo



  
Prof. Sandra Fernández

  
Prof. Victoria Navas  
(Tutor)

*A mi mamá, que, con su ejemplo, me enseñó el valor del esfuerzo y la constancia*

*A mi papá, que, con su sonrisa dulce y sincera, estuvo siempre ahí para apoyarme*

*A mi hermano Raico, que forjó gran parte de mi carácter y personalidad*

*A mi Barbarita, mi hermanita, mi compañera de infancia y juventud, que fue mi cordura y*

*mi ánimo ante las ganas de desistir*

*A quien es capaz de hablar y leer en hexadecimal, binario y sindarín:*

ḄćŦm þ̄m̄q ƧŦ ꞑć Ƨp̄Ŧꞑꞑ ꞑć

*A todos mis amigos*

*A todos mis enemigos*

*A todos los que han sido una ayuda y un obstáculo*

*Soy yo, y esto es, gracias a ustedes.*

## Agradecimientos

Recuerdo en mis clases de genética, cómo la profe Yadira hacía una simplificación elegante y linda desde mi perspectiva, de la causalidad de lo observable y lo medible en los organismos vivos. Era esta ecuación: FENOTIPO = GENOTIPO + AMBIENTE.

Queriendo extrapolar el fenotipo de los seres humanos, no solo a sus características físicas y biológicas como individuo, sino a su desenvolvimiento en el mundo en pro de aumentar el *fitness* propio, me gusta pensar en cada una de las variables que nos han moldeado a lo largo de nuestra vida hasta darnos nuestra identidad, como una casualidad mágica, como estructuras disipativas alejadas del equilibrio termodinámico, que de haber sido un poquito distintas, fuese otra persona y no yo la que escribiese estas líneas.

Se me hace entonces necesario agradecer al DNA, “la molécula perfecta” y a la selección natural por ser la materia y el artista, la arcilla y el escultor de cada una de las criaturas maravillosas (y de las terribles) que me han conducido hasta este instante y este logro. Sin ustedes todo lo demás sería contingente.

Agradezco a mi mamá y a mi papá, que han sido los mejores padres del mundo. Más allá de las diferencias, tengo la certeza de que siempre hicieron su mayor esfuerzo para que yo fuese una mujer empática, responsable y de principios. Un término completo de la ecuación es de ustedes.

Agradezco a mis primeros y más fieles amigos, mis hermanos. Han sido la alegría de mi vida, la admiración, el compañerismo, la amistad incondicional, ¡un *shonen* hecho realidad!

Agradezco a la UCV, la Facultad de Ciencias, la Escuela de Biología y a todos los profesores que contribuyeron a mi formación académica. En ningún lugar del mundo me he sentido tan a gusto como en mi facultad, la más hermosa de todas, con las personas más dulces, divertidas, excéntricas e interesantes. ¡Gracias Leandro Aristeguieta por los jardines!

Agradezco a la profe Mina, por darme su confianza y permitirme ingresar como tesista a su laboratorio, por su excelente asesoría y orientación, por ponerme los pies sobre la tierra y darme siempre soluciones a todos los inconvenientes. Por las mejores clases de genética y por mostrarnos a todos sus alumnos lo bonito que es la vocación y la pasión de hacer lo que nos gusta, por más abrumador y exigente que pueda ser.

Agradezco al profe Giovanni que, aunque su nombre no aparezca en la tesis fue mi tutor inicialmente y me enseñó casi todo lo que sé de cómo trabajar en microbiología. Siempre estuvo pendiente de que no nos faltara nada en el laboratorio, de hacerse cargo de la reparación y el mantenimiento de los equipos, de descongelar la nevera, de apagar el destilador, cosas que parecerán simples, pero cómo se nota su ausencia profe.

A mi tutora, la profe Victoria Navas, por adoptarme sobre la marcha, soportarme y apoyarme todos estos meses a pesar de mi genio y mi carácter. Por ser siempre receptiva a mis dudas, por las correcciones del escrito siempre rápidas y constructivas, y por mantener siempre esa buena actitud en el laboratorio aún con todas las dificultades del país.

A mis jurados, las profesoras Roxana Gajardo y Sandra Fernández por la paciencia y las sugerencias. A la profe Beatriz y la profe Indira por permitirme trabajar en el CVCM cuando lo necesité. Al profe Víctor Hugo por toda la ayuda con la estadística, y las conversaciones super interesantes de música, series y videojuegos. Al profe Blas Dorta por siempre ser excesivamente amable y abrirme tantas veces el instituto en días feriados y fines de semana.

Con todo el cariño del mundo, a mis amigos de la carrera por los recuerdos encantadores: A Javier por ayudarme tantas veces en el laboratorio, por su alegría contagiosa, por creer siempre en mí, y por ser un ejemplo de fuerza y perseverancia ante la adversidad. A Fernando por ser atento, colaborador y amable, por enseñarme a manejar y así poder subir al IBE, y por toda la confianza acumulada estos años de amistad. A Sebastian por las conversaciones cortitas y profundas, por no olvidarme a pesar de la distancia, por Jean Valjean y Cosette, por darme la criatura gatuna más bella y mágica del universo, a Héctor por aguantar tanto chalequeo y no odiarme en el proceso, por prestarse para discusiones filosóficas intrascendentes, por motivarme muchas veces que estaba obstinada de la tesis y por acordarse siempre de mi cumpleaños, a Frank por ser tan dulce conmigo estos últimos meses en sus visitas y en sus detalles (gracias por los heladitos), por animarme siempre que los experimentos no daban, por escribir siempre, aun cuando lo dejaba en visto. A Eli!!! mi compañera y confidente de laboratorio, de escritura, de hacer ejercicio, de estos meses tan complejos... pocas personas han compartido tanto conmigo y me quieren tal cual soy. Todo hubiese sido mucho más difícil de no contar con tu compañía y tu buen humor. A mi hermosa amiga Marylyn a quién extraño profundamente, a Yanetza, Daniela, Andreina, Sou. Mis amigos de la Facultad: Hernán, Diego, Edgar, Yudimar, la profe Alicia Cáceres que ha sido un amor conmigo y siempre me daba la razón cuando yo peleaba, la profe Karla Cáceres que estuvo super pendiente con todo el problema de transporte, la profe Edith con quien almorcé tantas veces, el profe Jesús Alberto y, el profe Rafael García que siempre me preguntaba cómo iba el escrito y me felicitaba cada vez que terminaba una partecita.

A mi tío por darme el carro para poder subir al instituto a culminar mis experimentos, por los chistes, por invitarme a ver GOT, por todos sus detalles conmigo. Al Sr. Plátano por llevarme durante los meses que tenía problemas con el transporte y por enseñarme tantas cosas útiles sobre la vida y como llevarme bien con los demás. A Yolanda por hacerme comida siempre. A la Sra. Mayora por cuidarme cuando estuve enferma y tratarme como a su hija.

A todas las bacterias que murieron en mis experimentos. A todos a quienes haya olvidado pero que de alguna manera estuvieron ahí para mí...

# ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Metales Pesados.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Biodisponibilidad.....	3
1.1.2 Toxicidad de los metales pesados.....	4
1.1.3 Clasificación de los metales pesados.....	6
1.1.4 Elementos Cadmio (Cd) y Zinc (Zn).....	6
1.1.5 Contaminación y Biorremediación.....	8
<b>1.2 Resistencia bacteriana a sustancias antimicrobianas.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Resistencia bacteriana a antimicrobianos durante la fase estacionaria de crecimiento.....	11
1.2.2 Mecanismos de resistencia a metales pesados.....	12
1.2.2.1 Mecanismos de resistencia a Cadmio en bacterias Gram negativas.....	15
1.2.2.2 Mecanismos de resistencia a Zinc en bacterias Gram negativas.....	16
1.2.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	17
1.2.4 Co-selección metales pesados – antibióticos.....	18

<b>1.3 Conjugación Bacteriana</b> .....	20
<b>1.4 Bacterias Gram negativas</b> .....	22
<b>1.4.1 <i>Escherichia coli</i></b> .....	24
<b>1.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	25
<b>1.4.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	25
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	26
<b>2.1 Estudios a nivel internacional</b> .....	26
<b>2.2 Estudios a nivel nacional</b> .....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	31
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>5.1 Cepas bacterianas</b> .....	33
<b>5.2 Cepas control</b> .....	33
<b>5.2 Medios de cultivo</b> .....	34
<b>5.2.1 Suplementos de los medios de cultivo</b> .....	35
<b>5.3 Ensayos de Viabilidad</b> .....	37
<b>5.3.1 Reactivación de los aislados</b> .....	37
<b>5.3.2 Pre-cultivo de los aislados</b> .....	37
<b>5.3.3 Viabilidad celular inicial</b> .....	38
<b>5.3.4 Viabilidad celular en medio líquido, en presencia de sales de metales pesados</b> .....	38
<b>5.4 Análisis Estadístico</b> .....	40
<b>5.5 Ensayos de Conjugación</b> .....	41

5.5.1 Viabilidad celular en medio sólido.....	42
5.5.2 Control de fenotipo.....	42
5.5.3 Mezcla de conjugación.....	43
5.5.4 Pruebas de co-transferencia.....	44
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>6.1 Ensayos de viabilidad en medio líquido.....</b>	<b>46</b>
6.1.1 Ensayos de viabilidad en función de la temperatura de incubación.....	46
6.1.2 Ensayos de viabilidad en presencia de CdCl <sub>2</sub> .....	48
6.1.2.1 Ensayos de viabilidad para aislados de <i>E. coli</i> .....	51
6.1.2.2 Ensayos de viabilidad para aislados de <i>P. aeruginosa</i> .....	53
6.1.2.3 Ensayos de viabilidad para aislados de <i>K. pneumoniae</i> .....	55
6.1.2.4 Estimación de la concentración mínima bactericida (MBC) de CdCl <sub>2</sub> .....	56
6.1.3 Ensayos de viabilidad en presencia de ZnCl <sub>2</sub> .....	58
6.1.3.1 Efecto de la concentración de ZnCl <sub>2</sub> sobre la viabilidad bacteriana.....	58
6.1.3.2 Ensayos de viabilidad en función de la temperatura de incubación y ZnCl <sub>2</sub> .....	61
6.1.3.3 Estimación de la concentración mínima bactericida (MBC) de ZnCl <sub>2</sub> .....	67
<b>6.2 Ensayos de viabilidad en medio sólido.....</b>	<b>69</b>
6.2.1 Ensayos de viabilidad en presencia de CdCl <sub>2</sub> .....	69
6.2.2 Ensayos de viabilidad en presencia de ZnCl <sub>2</sub> .....	70
6.2.3 Estimación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MBC).....	70

<b>6.3 Proceso de Conjugación bacteriana</b> .....	71
<b>6.3.1 Pruebas de Co-transferencia</b> .....	74
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	75
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	91
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	92
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	94

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>I.</b>	Aislados bacterianos utilizados.....	34
<b>II.</b>	Concentraciones mínimas inhibitorias reportadas para <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> .....	35
<b>III.</b>	Concentraciones de $ZnCl_2$ utilizadas en los ensayos a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	36
<b>IV.</b>	Concentraciones de los antibióticos utilizados.....	36
<b>V.</b>	Concentraciones de $CdCl_2$ y $ZnCl_2$ utilizadas en los ensayos de viabilidad en medio sólido.....	42
<b>VI.</b>	Antibióticos utilizados en las pruebas de co-transferencia.....	45
<b>VII.</b>	Título bacteriano para cada aislado a las 48 h de incubación a 25 °C, 37 °C y 48 °C, creciendo en ausencia y en presencia de $CdCl_2$ .....	49
<b>VIII.</b>	Efecto de los factores cepa, temperatura, concentración de $CdCl_2$ , y sus interacciones, sobre la viabilidad de los aislados bacterianos.....	50
<b>IX.</b>	Efecto de los factores cepa, temperatura y sus interacciones sobre la FS de los aislados, en los ensayos con 2,5 mM de $CdCl_2$ .....	52
<b>X.</b>	Efecto de los factores cepa, temperatura y sus interacciones sobre la FS de los aislados, en los ensayos con 5,6 mM de $CdCl_2$ .....	54
<b>XI.</b>	Porcentaje de reducción de la viabilidad y concentración mínima bactericida (MBC) de $CdCl_2$ para los aislados de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	57
<b>XII.</b>	Título bacteriano y porcentaje de reducción de la viabilidad para cada aislado a 37 °C, en presencia de distintas concentraciones de $ZnCl_2$ .....	58

<b>XIII.</b> Título bacteriano para cada aislado a las 48 h de incubación a 25 °C, 37 °C y 48 °C, creciendo en ausencia y en presencia de ZnCl <sub>2</sub> .....	62
<b>XIV.</b> Porcentaje de reducción de la viabilidad y concentración mínima bactericida (MBC) de ZnCl <sub>2</sub> para los aislados de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	68
<b>XV.</b> Viabilidad bacteriana en AN suplementado con distintas concentraciones de CdCl <sub>2</sub> .....	69
<b>XVI.</b> Viabilidad bacteriana en AN suplementado con distintas concentraciones de ZnCl <sub>2</sub> .....	70
<b>XVII.</b> Concentración mínima inhibitoria (MIC) de CdCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> en AN para los aislados de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> a 37 °C.....	71
<b>XVIII.</b> Resultados del proceso de conjugación bacteriana para los marcadores de resistencia a AMP, CdCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> .....	73
<b>XIX.</b> Frecuencia de conjugación para el marcador de selección AMP.....	73
<b>XX.</b> Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas transconjugantes.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Rutas de las reacciones Fenton y Haber-Weiss.....	5
2. Curva típica de crecimiento de una población bacteriana.....	12
3. Mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados.....	14
4. Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos.....	18
5. Mecanismos moleculares que dan lugar a la Co-Selección de genes de resistencia a metales y antibióticos.....	19
6. Representación esquemática del proceso de conjugación en bacterias Gram negativas.....	22
7. Representación esquemática de la pared celular Gram negativa, con detalles de su composición.....	24
8. Patrón de siembra en placas de AN y AN suplementado, para ensayos de conjugación.....	44
9. Título bacteriano de los aislados en fase de crecimiento estacionaria, incubados a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	47
10. Fracción de supervivencia (FS) de los aislados de <i>E. coli</i> , y <i>P. aeruginosa</i> PB12', en presencia 2,5 mM de CdCl <sub>2</sub> , a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	51
11. Fracción de supervivencia (FS) de los aislados pertenecientes a la especie <i>P. aeruginosa</i> en presencia de 5,6 mM de CdCl <sub>2</sub> , a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	53
12. Fracción de supervivencia (FS) de los aislados pertenecientes a la especie <i>K. pneumoniae</i> en presencia de 15 mM de CdCl <sub>2</sub> , a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	56
13. Fracción de supervivencia (FS) de <i>E. coli</i> J62-2 en presencia de 0,5 mM de ZnCl <sub>2</sub> , a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	64

<b>14.</b> Fracción de supervivencia (FS) de <i>P. aeruginosa</i> N242 en presencia de 7 mM de ZnCl <sub>2</sub> , a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	65
<b>15.</b> Fracción de supervivencia (FS) de <i>E. coli</i> 3663 en presencia de 1,5 mM de ZnCl <sub>2</sub> , a 25 °C, 37 °C y 42 °C.....	66

## ABREVIATURAS

ABC: ATP binding cassette.

AMK: Amikacina.

AMP: Ampicilina.

AN: Agar nutritivo.

As: Arsénico.

ATM: Aztreonam.

ATP: Trifosfato de adenosina.

CAZ: Ceftazidima.

Cd: Cadmio.

Cd<sup>2+</sup>: Ión cadmio.

CdCl<sub>2</sub>: Cloruro de cadmio.

CEP: Cefalotina.

CHL: Cloranfenicol.

CIP: Ciprofloxacina.

CN: Caldo nutritivo

Co: Cobalto.

Cr: Cromo.

CRO: Ceftriaxona.

CTX: Cefotaxima.

Cu: Cobre.

DAP: Ácido diaminopimélico.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DO: Densidad óptica.

e<sup>-</sup>: Electrón.

EPS: Exopolisacárido.

Fe: Hierro.

FEP: Cefepime.

FS: Fracción de supervivencia.

GEN: Gentamicina.

GSH: Glutación.

H: Hidrógeno.

Hg: Mercurio.

H<sub>2</sub>O: Agua.

IUPAC: Unión internacional de química  
pura y aplicada.

KAN: Kanamicina.

KDO: Cetodesoxioctonato.

LBPB: Laboratorio de Biología de  
Plásmidos Bacterianos.

LPS: Lipopolisacáridos.

LVX: Levofloxacina.

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

MBC: Concentración mínima bactericida.

MFS: Familia de facilitadores principales.

Mg: Magnesio.

Mn: Manganeso.

Mo: Molibdeno.

NRAMP: Proteínas de macrófago, asociadas a la resistencia natural.

NET: Netilmicina

Ni: Níquel.

NiCd: Níquel – Cadmio.

O<sub>2</sub>: Oxígeno molecular.

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Anión superóxido.

OMS: Organización mundial de la salud.

OFX: Ofloxacina.

OH<sup>-</sup>: Ión hidróxido.

OH<sup>•</sup>: Radical hidroxilo.

PIP: Piperacilina.

Pb: Plomo.

REDOX: Óxido reducción.

RNA: Ácido ribonucleico.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RND: Familia de resistencia, nodulación y división celular.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

% Rx: Porcentaje de reducción de la viabilidad.

SD: Desviación estándar.

SOD: Superóxido dismutasa.

ssDNA: DNA de cadena sencilla.

STR: Estreptomicina.

SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol.

T4CP: Proteína de acoplamiento T4.

TCY: Tetraciclina.

TOB: Tobramicina.

TSS4: Sistema de secreción tipo 4.

TZP: Piperacilina-Tazobactam.

UFC: Unidades formadoras de colonias

V: Vanadio.

ZIP: Proteínas tipo Zrt.

Zn: Zinc.

Zn<sup>2+</sup>: Ion zinc.

ZnCl<sub>2</sub>: Cloruro de zinc.

## RESUMEN

El uso mantenido e inadecuado de antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, así como en prácticas agrícolas y ganaderas, ha promovido la propagación de los genes de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas. Además, en los últimos años las evidencias sugieren que el incremento en las concentraciones de metales pesados en el ambiente, puede contribuir con la selección de los marcadores de resistencia a antibióticos en las comunidades microbianas por mecanismos de co-selección.

En este sentido, algunas bacterias pueden haber adquirido los genes de resistencia a antibióticos, como consecuencia de la presión selectiva generada por la contaminación con metales pesados, tales como el Cadmio (Cd) y el Zinc (Zn) y, debido a los mecanismos de transferencia horizontal, los genes asociados hayan sido diseminados en las poblaciones bacterianas. Debido a que estos metales se encuentran frecuentemente en el ambiente como contaminantes, y además existen reportes de resistencia conjunta a estos metales y antibióticos, se hace necesaria la caracterización del perfil de resistencia a Cd y Zn en las cepas patógenas.

El objetivo de esta investigación consistió en caracterizar el fenotipo de resistencia al  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$  en aislados bacterianos y su capacidad de transferencia por conjugación.

Para esto se realizaron ensayos de viabilidad en medio líquido, con aislados clínicos Gramnegativos, a distintas concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ , a 25 °C, 37 °C y 42 °C. Se determinó que las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  utilizadas presentaron efectos bactericidas en las tres temperaturas de incubación ensayadas. Mientras que las concentraciones de  $\text{ZnCl}_2$  empleadas presentaron efectos bactericidas a 37 °C, y bacteriostáticos a 25 °C y/o a 42 °C para la mitad de los aislados. En los ensayos de viabilidad realizados en medio sólido, se

obtuvo que únicamente los aislados pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* presentaron resistencia a 1 mM de CdCl<sub>2</sub>, y a 1 mM y 3 mM de ZnCl<sub>2</sub>. Para evaluar la diseminación de los determinantes de resistencia a Cd y a Zn por transferencia horizontal, se realizó el proceso de conjugación en medio líquido con las cepas resistentes a estos metales. Como resultados se obtuvo que, ningún aislado fue capaz de transferir los marcadores de resistencia a Cd y Zn, lo que sugiere que los mecanismos de resistencia posiblemente se encuentran codificados en genes cromosomales o en plásmidos no conjugativos.

Aunque los resultados de esta investigación no mostraron una relación entre los genes de resistencia a antibióticos y los genes de resistencia a Cd y Zn. Se deben continuar estudiando los factores que contribuyen a la aparición y propagación de los genes de resistencia a antimicrobianos, para formular prácticas y políticas de salud pública que permitan combatir esta problemática.

**Palabras clave:** Bacterias Gramnegativas, aislados clínicos, resistencia bacteriana, cadmio (Cd), zinc (Zn), antibióticos, presión selectiva, temperatura, conjugación bacteriana, *P. aeruginosa*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados han sido empleados por los seres humanos en la elaboración de distintos objetos y herramientas desde hace 5000 años aproximadamente. Estos a su vez, presentan propiedades antimicrobianas, y eran utilizados para tratar infecciones antes del descubrimiento de los antibióticos (Pal y col., 2017).

Debido a que las bacterias han sido expuestas a estas sustancias, tanto por acción antrópica, como por su presencia natural en el ambiente, pueden presentar genes de resistencia a metales en su genoma. Estos son transferidos verticalmente al replicarse, y horizontalmente entre distintas cepas y especies. Asimismo, el aumento en la contaminación ambiental por metales, ha promovido la selección de estos genes en las poblaciones bacterianas (Baker-Austin y col., 2006).

Por otro lado, los genes que confieren resistencia a antibióticos han estado en las poblaciones bacterianas desde hace al menos 15000 años (Pal y col., 2017). Sin embargo, luego de la aparición de los antibióticos comerciales, la presión selectiva provocada por su uso en clínica y procesos agrícolas, ha promovido la evolución y esparcimiento de los genes de resistencia a antibióticos. Con lo que la cantidad de cepas resistentes y multirresistentes se ha incrementado (Allen y col., 2010; Pal y col., 2017; Peterson y Kaur, 2018).

Al aumentar la concentración de metales y antibióticos en el ambiente, no es de extrañar que la resistencia bacteriana a metales haya sido reportada en conjunto a la resistencia a antibióticos en distintas cepas ambientales y de origen hospitalario (Alonso y col., 2001; Perron y col., 2003; Baker-Austin y col., 2006; Seiler y Berendonk, 2012; Pal y col., 2017). Evidenciando la selección conjunta de marcadores de resistencia a antibióticos y a metales pesados en las bacterias.

La Co-Selección de la resistencia a metales pesados y antibióticos en bacterias, tiene importantes implicaciones ambientales, diagnósticas y clínicas, ya que puede mantener y promover la resistencia a antibióticos aún en ausencia de los mismos, causando graves problemas de salud pública (Pal y col., 2017).

En este sentido, existe la posibilidad de que algunas bacterias patógenas resistentes y multirresistentes, hayan adquirido los genes de resistencia a antibióticos, como consecuencia del aumento de las concentraciones de metales pesados en el ambiente. Para comenzar a estudiar esta problemática, se hace necesaria la caracterización del perfil de resistencia a metales pesados de las cepas patógenas.

### **1.1 Metales pesados**

La definición de metales pesados es controversial y puede variar dependiendo del autor. Sin embargo, existe cierto consenso en que son elementos de número atómico mayor a 20 (exceptuando metales alcalinos y alcalinotérreos), con una densidad específica mayor o igual a  $5 \text{ g/cm}^3$ , y que presentan alta toxicidad (Mejía, 2006; Yagnentkovsky, 2011; Beltrán y Gómez, 2015; Beltrán y Gómez, 2016; Covarrubias y col., 2015; Gupta y col., 2016).

Los metales pesados se encuentran de forma natural en el ambiente a bajas concentraciones. Se localizan en yacimientos minerales, producto de la erosión, meteorización de rocas y deposición atmosférica. Sin embargo, la disposición inadecuada de desechos domésticos, industriales, agrícolas y de aguas residuales, ha promovido el incremento de su concentración en algunos ecosistemas (Beltrán y Gomez, 2015; Beltrán y Gómez, 2016). Esta situación ha traído como consecuencia alteraciones en la estructura y composición de la biota, así como la incorporación de estos elementos a las tramas tróficas, pudiendo en muchos casos llegar hasta el hombre (Dixit y col, 2015).

### 1.1.1 Biodisponibilidad

Los metales pesados no se degradan en función del tiempo, sino que pueden estar presentes en el ambiente formando parte de distintas especies químicas (Yagnentkovsky, 2011; Covarrubias y col., 2015). No obstante, no todas las formas químicas son incorporadas por los seres vivos. Para que sean asimilados y ejerzan su efecto tóxico, los metales deben estar biodisponibles en su medio.

La biodisponibilidad de los metales se refiere al proceso dinámico mediante el cual, una fracción de la cantidad total de un metal en un compartimento ambiental específico, está disponible para su absorción por microorganismos u otros organismos a partir de su entorno directo, dentro de un período de tiempo determinado (Olaniran y col., 2013). A partir del suelo como compartimiento ambiental, algunos autores dividen el proceso de la siguiente manera: (1) liberación del metal de la fase sólida del suelo; (2) transporte de los metales libres o unidos a otras sustancias, hacia la membrana celular de un organismo; (4) transporte a través de la membrana celular hacia el citoplasma; (5) incorporación del metal a los procesos metabólicos del organismo (NRC Committee, 2003).

La biodisponibilidad de los metales pesados puede variar en función de factores fisicoquímicos y biológicos. Los primeros son los principales responsables de las interacciones que ocurren entre el medio y los metales pesados, y dependen de las características del medio (pH, composición, salinidad), las propiedades del metal (hidrofobicidad, solubilidad en agua y constante de disociación ácida) y los procesos de transformación/degradación que puede sufrir el metal en el medio. Los segundos, biológicos, son aquellos mediante los cuales, los metales pesados son transportados a un organismo y, son dependientes de su fisiología y genética. Por ejemplo, la presencia de genes que codifican

para proteínas de bombas y canales, la estructura de la pared celular, entre otros (Cipullo y Campo., 2018).

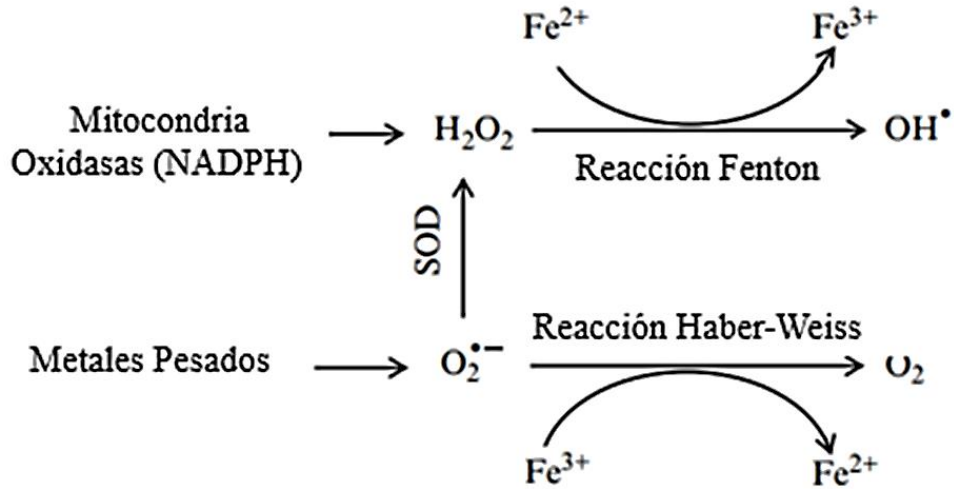
Por otro lado, un factor poco estudiado, pero que podría ejercer un efecto determinante en la biodisponibilidad de los metales es la temperatura. Debido a que, al modificar la velocidad de las reacciones químicas, se podría también alterar el flujo de los metales hacia el interior celular. Sin embargo, no solo la tasa de influjo hacia la célula, sino de eflujo puede aumentar con este factor, con lo que la acumulación intracelular podría o no variar (John y Leventhal, 1995), y con esto la toxicidad de los metales.

### **1.1.2 Toxicidad de los metales pesados**

La toxicidad de los metales pesados en los seres vivos se debe principalmente a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente, por sus siglas en inglés), y a sus propiedades de coordinación.

Los metales pesados con varios estados de oxidación, como el Fe y el Cu, promueven la producción de ROS a través de las reacciones Fenton y Haber-Weiss en organismos eucariotas y procariotas. En la Figura 1 se describe el proceso en células eucariotas.

Por otro lado, aquellos metales con un solo estado de oxidación, como Pb, Cd, As, Hg, Ni y Zn, inhiben la actividad enzimática como resultado de su afinidad por los grupos sulfhidrilos de las proteínas. El desplazamiento de los cofactores de su sitio de unión a la enzima por cationes de metales pesados, altera el balance de ROS en las células, provocando una sobreproducción de las mismas (Whitacre, 2014).



**Figura 1:** Rutas de las reacciones Fenton y Haber-Weiss. Se muestra la producción de radicales libres de  $\text{O}_2$  en células eucariotas. Durante la fosforilación oxidativa el  $\text{O}_2$  se reduce a  $\text{H}_2\text{O}$ . En este proceso se generan ROS como subproductos. Dentro de las células existen proteínas y péptidos que mantienen el balance de ROS debido a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, los metales pesados interactúan con las moléculas antioxidantes al ingresar a las células, alterando su funcionamiento y, causando un aumento de ROS, como  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . En la reacción Fenton, el peróxido de hidrógeno generado durante la fosforilación oxidativa, oxida al  $\text{Fe}^{2+}$  produciendo el radical  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . En la reacción Haber-Weiss, el  $\text{Fe}^{3+}$  es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  por  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el cual sufre una reacción Fenton posterior. Por otro lado, la SOD cataliza la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a partir del ion superóxido. SOD: Superóxido Dismutasa. Tomado y modificado de: Whitacre, 2014.

### **1.1.3 Clasificación de los metales pesados**

Aunque todos los metales pesados ejercen efectos tóxicos a determinadas concentraciones, algunos de ellos son necesarios para los organismos vivos en cantidades traza.

Desde el punto de vista biológico, aquellos con una función biológica conocida son clasificados como metales pesados esenciales. Estos son Co, Cu, Mn, Mo, y Zn (Yagnentkovsky, 2011). Mientras que aquellos sin función biológica conocida son sumamente tóxicos, pueden acumularse en tejidos vivos y, se clasifican como no esenciales. Estos son el Cd, Cr, Hg, y Pb (Yagnentkovsky, 2011)

### **1.1.4 Elementos Cadmio (Cd) y Zinc (Zn)**

Tanto el Zn como el Cd son elementos del grupo 12 (IUPAC) o grupo 2B (nomenclatura estándar de USA) de la tabla periódica, lo que les confiere una configuración electrónica externa y propiedades químicas similares, presentando un sólo estado de oxidación (2+) (Chang, 2002). El Zn es el elemento n° 30 de la tabla periódica, está ubicado en el periodo 4 y tiene un peso atómico de 65,39 g/mol. Mientras que el Cd es el elemento n° 48 de la tabla periódica, está ubicado en el periodo 5 y tiene un peso atómico de 112,4 g/mol (Brown y col., 2009).

El Zn a temperatura ambiente es un sólido cristalino y frágil que puede reaccionar con ácidos diluidos y con no metales formando sales. Representa entre el 0,0005 % y el 0,02 % de la corteza terrestre, y se encuentra en todos los alimentos, el aire, el suelo y el agua (Irwin, 1997).

El Zn es un metal pesado esencial, y es incorporado a las células de los organismos vivos por proteínas transportadoras. Este elemento es utilizado en múltiples procesos

biológicos tales como, metabolismo de biomoléculas, neurotransmisión, secreción hormonal, señalización celular y regulación del sistema inmune (Maret y Weed, 2014).

En los seres humanos, un desbalance en la homeostasis del Zn causa alteraciones fisiológicas. Una ingesta insuficiente de este metal desencadena enfermedades cutáneas, trastornos reproductivos, inmunológicos, del desarrollo, entre otros. En contraposición, un exceso de Zn es fijado en riñones e hígado, y bloquea la absorción de elementos como fósforo y calcio. Puede producir carcinogénesis, y existen evidencias de una correlación positiva con la deposición de  $\beta$ -amiloides en el Alzheimer (Mielcar y Smolinska, 2017).

En lo que respecta al Cd, este es un metal blando y blanco azulado a temperatura ambiente, que se encuentra generalmente en la litósfera formando minerales con Zn, Pb y Cu. Su uso principal (aproximadamente un 70 %) es en baterías de NiCd (Maret y Weed, 2014).

El Cd es un metal pesado no esencial, y los efectos provocados por su exposición son: desbalance de la regulación de calcio, fragilidad ósea, desbalance endocrino, hepatotoxicidad, carcinogénesis, mutagénesis, entre otros (Dixit y col, 2015). También puede alterar el metabolismo del Zn, inhibiendo las enzimas con motivos de unión a este metal y compitiendo por la absorción intestinal. Disminuye la concentración de ceruloplasmina, hemoglobina y hematocrito, así como de Cu en el hígado y plasma sanguíneo (Flora y col., 2008).

Por otro lado, si bien el Cd no tiene función biológica conocida, este metal es incorporado al interior celular por proteínas transportadoras de otras moléculas con propiedades químicas similares, entre ellos, el Zn y el Mg (Maret y Weed, 2014).

### 1.1.5 Contaminación y biorremediación

El Zn y el Cd son dos metales pesados de interés comercial que se encuentran asociados a desechos domésticos e industriales (Jaishankar y col., 2014). Las sales de Zn son utilizadas en la industria como parte de pinturas, conservantes de maderas, cerámicas, cosméticos, entre otros (Irwin, R., 1997). Mientras que el Cd se utiliza mayormente en baterías de níquel-cadmio, en metalurgia, galvanoplastia, en la producción de pinturas y fertilizantes (Maret y Weed, 2014).

Una inadecuada disposición de estos productos al final de su vida útil, así como de los desechos industriales generados en su manufactura, ha promovido que la concentración de ambos metales en suelos urbanos y agrícolas haya incrementado a nivel mundial, convirtiéndose en contaminantes, y excediendo en muchos casos los límites máximos permitidos por las organizaciones internacionales de vigilancia y protección ambiental (Su y col., 2014).

La contaminación por metales pesados se refiere a la entrada excesiva de estos compuestos al suelo, agua y/o aire debido a actividades humanas. La magnitud de la incorporación de los metales pesados al suelo es proporcional a la cercanía de las ciudades, y está relacionada con el nivel de desarrollo industrial, la densidad poblacional, el uso de la tierra y el tráfico vehicular. Por otro lado, la contaminación también puede propagarse a través del agua y el viento mediante la irrigación de aguas residuales, el uso de fertilizantes, y la movilización de desechos sólidos industriales y de minería (Su y col., 2014).

Debido a que la exposición a metales pesados, presenta riesgos para los organismos vivos, se han desarrollado estrategias que permiten eliminar estas sustancias químicas tóxicas y contaminantes del ambiente. Los enfoques tradicionales basados en las propiedades

fisicoquímicas del contaminante, son costosos, poco específicos y, a menudo, generan productos secundarios remanentes (Arif y col., 2013). Mientras que la biorremediación, que consiste en el empleo de microorganismos con propósito de eliminar los contaminantes (Madigan y col., 2009), ha demostrado ser más amigable con el medio ambiente, además de tener mayor especificidad (Arif y col., 2013). Para ello, es frecuente utilizar microorganismos que posean mecanismos de resistencia a dichas sustancias.

## **1.2 Resistencia bacteriana a sustancias antimicrobianas**

Las bacterias son organismos ubicuos que por lo general viven en asociación con otros microorganismos en comunidades mixtas. En la naturaleza, la diversidad y abundancia de microorganismos de las comunidades microbianas, está controlada por los recursos y por las condiciones fluctuantes que existan en el entorno (Madigan y col., 2009).

Las poblaciones microbianas dentro de una comunidad, interaccionan, cooperan y compiten de distintas formas afectando la supervivencia de los organismos presentes. Algunos hongos y bacterias producen sustancias que inhiben el crecimiento o producen la muerte de otros microorganismos, por lo que son llamadas antimicrobianas (Pal y col., 2017).

Las sustancias antimicrobianas son aquellos compuestos químicos naturales o sintéticos, que matan o impiden el crecimiento de los microorganismos (Sandle, 2016). Entre ellas se encuentran los antibióticos y los metales pesados (Pal y col., 2017).

Los antibióticos son antimicrobianos cuya acción está dirigida a estructuras o procesos bacterianos específicos, y que pueden actuar inhibiendo el crecimiento o matando directamente las bacterias. Pueden derivarse de compuestos producidos de forma natural por otros organismos vivos, o ser sintetizados en el laboratorio (Maddison y col., 2008).

Pueden ser clasificados como bacteriostáticos, si eliminan cierta parte de la población bacteriana, usualmente entre un 90 a 99 %. O bactericidas cuando eliminan más del 99 % de la población, con un tiempo de incubación habitual de 18 a 24 horas (Pankey y Sabath, 2004).

Por otro lado, los metales pesados poseen amplio espectro de acción, y presentan distintos mecanismos y blancos celulares (Pal y col., 2017).

Las células bacterianas pueden exhibir distintos fenotipos como consecuencia de su exposición a los agentes antimicrobianos. Estos son susceptibilidad, resistencia, tolerancia y persistencia (Brauner y col., 2016).

La resistencia bacteriana se define como la capacidad de una cepa de crecer en presencia de un antimicrobiano, a concentraciones superiores respecto a la concentración necesaria para eliminar otras cepas de la misma especie, independientemente de la duración del tratamiento. La resistencia es codificada de manera intrínseca, o es adquirida a través de mutaciones y es transferida de forma hereditaria (Brauner y col., 2016).

Un parámetro comúnmente empleado para cuantificar la resistencia, es la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), la cual se define como la menor concentración de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano visible (Brauner y col., 2016). La MIC generalmente se determina exponiendo un cultivo bacteriano a una serie de concentraciones crecientes del antimicrobiano durante un tiempo determinado (Li y col., 2017)

Otro parámetro microbiológico complementario a la MIC, consiste en determinar la concentración mínima bactericida (MBC, por sus siglas en inglés), que es la concentración más baja de un agente antimicrobiano, que elimina el 99,9 % de una población bacteriana o más, después de un periodo de exposición definido (Goins, 2017).

### 1.2.1 Resistencia bacteriana a antimicrobianos durante la fase estacionaria de crecimiento

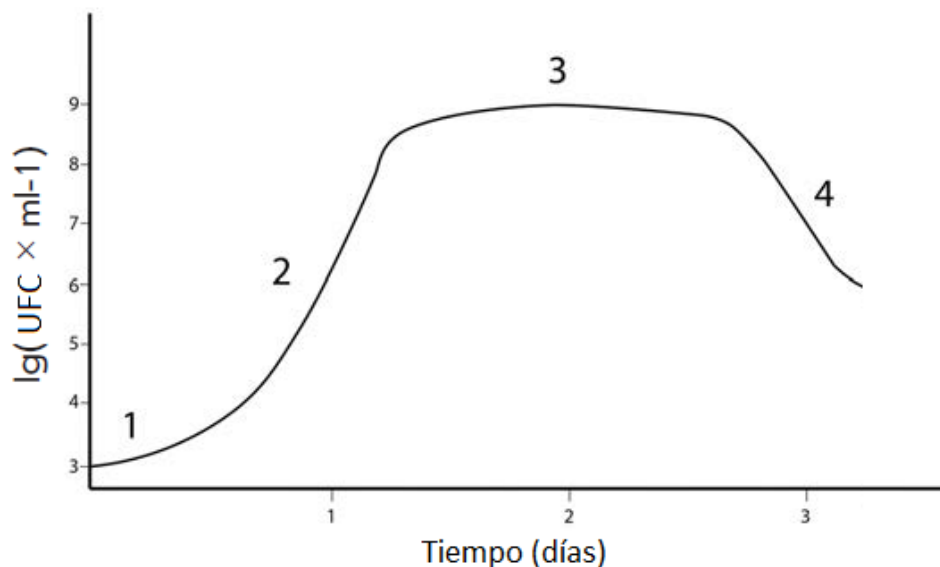
Durante el tiempo de vida de los microorganismos, la expresión génica y la fisiología bacteriana son dinámicas, de tal forma que presentan distintas características dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentran. En este sentido, en algunos estudios se han reportado cepas susceptibles a un antibiótico durante la fase de crecimiento exponencial, pero varios órdenes de magnitud más resistentes durante la fase de crecimiento estacionaria (Sengupta y col., 2013).

Un cultivo bacteriano se encuentra en crecimiento cuando las células que lo conforman se dividen secuencialmente formando dos células hijas idénticas (Pletnev y col., 2015). Este proceso consta de 4 fases consecutivas (Figura 2).

La fase lag o de latencia, constituye el periodo de tiempo entre la inoculación de un medio de cultivo y el comienzo del crecimiento bacteriano. Durante este tiempo se sintetiza la maquinaria enzimática requerida por el microorganismo en su mantenimiento y reproducción. Tiene una duración variable, y depende de las condiciones previas en las que se encontrara el inóculo (Madigan y col., 2009).

Luego, en la siguiente fase, las células se replican exponencialmente debido a la abundancia de recursos en el medio. Una vez los nutrientes comienzan a agotarse y los productos de desecho a acumularse, se observa la fase estacionaria, en la cual existe un equilibrio entre el aumento y la disminución en el número de células y, en consecuencia, el crecimiento tiene un comportamiento constante (Madigan y col., 2009).

Por último, en la fase de muerte la tasa de muerte es superior a la de división y el título bacteriano disminuye progresivamente (Madigan y col., 2009).



**Figura 2:** Curva típica de crecimiento de una población bacteriana. Se observa el título bacteriano en unidades formadoras de colonias (UFC) por volumen de cultivo en mL, respecto al tiempo de incubación en días. 1. Fase de latencia o fase Lag. 2. Fase exponencial o fase logarítmica. 3. Fase estacionaria. 4. Fase de muerte. Tomado y modificado de Pletnev y colaboradores, 2015.

Durante la fase estacionaria de crecimiento ocurren cambios en la expresión génica que favorecen la supervivencia de los microorganismos en condiciones de estrés, el DNA que forma parte del nucleóide se encuentra compactado y condensado, haciéndolo inaccesible a las nucleasas, y ocurren modificaciones morfológicas en las células bacterianas que las hacen más pequeñas y esféricas, y sus paredes y membranas celulares más rígidas y menos fluidas (Pletnev y col., 2015).

### 1.2.2 Mecanismos de resistencia a metales pesados

Los mecanismos moleculares que confieren resistencia a metales pesados son bombas de eflujo, bioadsorción, bioacumulación, biotransformación y biomineralización.

Las bombas de eflujo, pueden ser ATPasas o bombas quimiosmóticas que expulsan del interior celular los cationes tóxicos que han entrado a la célula por sistemas de transporte

de nutrientes no específicos expresados constitutivamente, o sistemas específicos que aumentan la eficiencia de captación de iones metálicos. Pueden estar codificadas tanto cromosomalmente, como en moléculas plasmídicas, y el tipo de bomba es variable dependiendo de la especie y la cepa bacteriana (Bruzual, 2002).

La bioadsorción bacteriana, es la retención pasiva de los contaminantes debido a interacciones electrostáticas entre los metales y los grupos funcionales de la pared celular de las bacterias (Vijayaraghavan y Yun, 2008). En el caso de las bacterias Gram negativas, los grupos fosfato son los responsables de este mecanismo (Chandra, 2015).

Algunos factores como pH, temperatura, concentración del metal y velocidad de agitación influyen en la bioadsorción, siendo el pH es uno de los más importantes. Bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} < 6$ ) los grupos funcionales de la superficie celular adquieren cargas positivas y repelen a los cationes metálicos, mientras que en condiciones básicas ( $\text{pH} > 7$ ) la mayoría de los metales forman precipitados, por lo que es necesario un control del pH adecuado en ensayos de bioadsorción (Chandra, 2015).

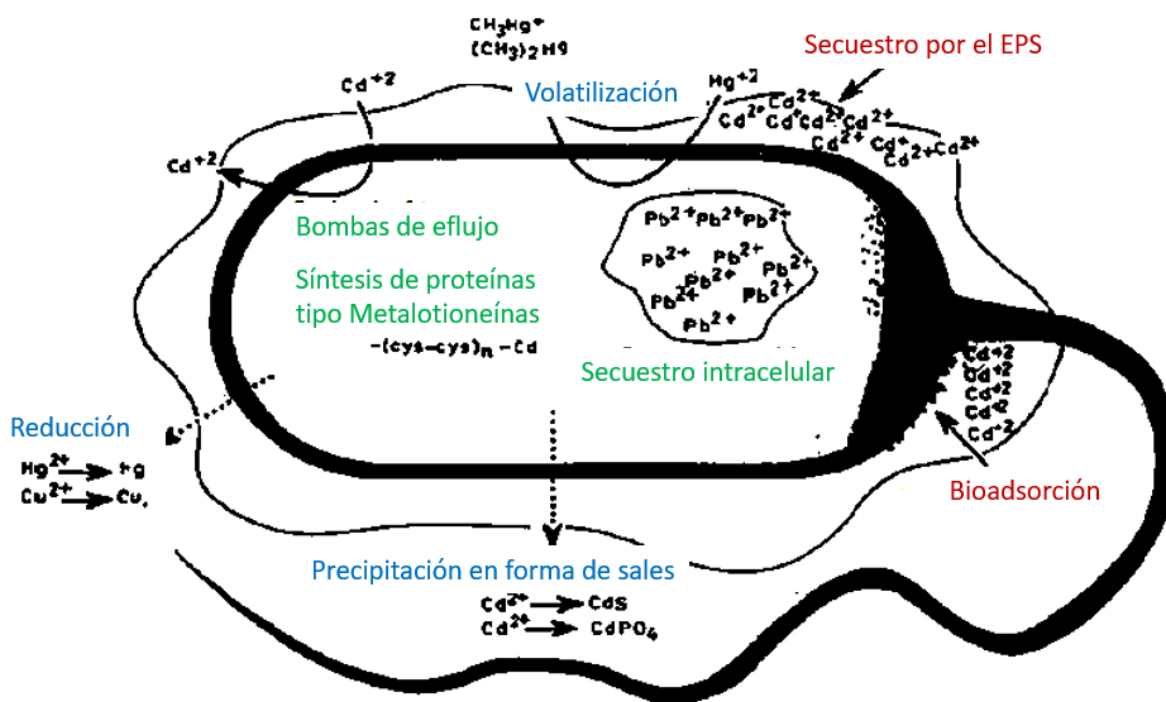
Por otro lado, la bioacumulación es la retención intracelular de sustancias tóxicas por células vivas. Estas son transportadas al citoplasma de forma activa, y una vez allí son acumuladas mediante el secuestro por proteínas con múltiples grupos sulfhidrilo, como las metalotioneinas (Vullo, 2003).

La biotransformación se refiere a los cambios químicos que puede sufrir el metal pesado, debido a la acción de enzimas microbianas, provocando una disminución de la solubilidad o un aumento en la volatilidad. Estas transformaciones son principalmente, cambios del estado de oxidación del metal, y metilación (Vullo, 2003).

Por último, la biomineralización se define como el conjunto de mecanismos que utilizan los microorganismos en la precipitación de metales. Puede ocurrir mediante el

empleo de bombas que expulsan hacia el exterior celular, el metal pesado que ingresó previamente a la célula, en contraposición a un flujo de  $H^+$  hacia el citoplasma. Esto genera un aumento del pH localizado sobre la superficie celular y, en consecuencia, el metal precipita. También se ha reportado biomineralización a través de la formación de sulfuros o fosfatos por enzimas microbianas (Vullo, 2003).

En la figura 3, se esquematizan los mecanismos mencionados.



**Figura 3:** Mecanismos de resistencia bacteriana a metales pesados. Los exopolisacáridos (EPS) disminuyen la difusión de los metales hacia el interior celular. La bioacumulación se lleva a cabo por el aumento de la síntesis de proteínas con motivos de unión a metales y el secuestro intracelular. La volatilización y la reducción, son dos formas de biotransformación, y la precipitación en forma de sales, un ejemplo de biomineralización. Las bacterias también poseen bombas de eflujo, como la ATPasa tipo P que expulsa el metal hacia el exterior celular. Modificado de Wasi y colaboradores (2012).

### 1.2.2.1 Mecanismos de resistencia a Cadmio en bacterias Gram negativas

En las bacterias se han descrito mecanismos de resistencia a Cd, y estos difieren para Gram positivas y Gram negativas. Al igual que con otros metales pesados, la pared celular es la primera barrera que deben atravesar los iones  $\text{Cd}^{2+}$  para ingresar al citoplasma. En bacterias Gram negativas se ha reportado bioadsorción de este metal a través de los grupos fosfato de la pared celular, lo cual contribuye a la resistencia al metal (Khan y col., 2015).

Por otro lado, el Cd que no es adsorbido, puede entrar a la célula bacteriana mediante canales de Mg tipo-T y, transportadores de las familias NRAMP, ZIP y ABC (Maret y Weed., 2014). Una vez en el citoplasma, ocurre el secuestro del metal por el tripéptido glutatión (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) disminuyendo el  $\text{Cd}^{2+}$  libre que puede unirse a las proteínas intracelulares alterando su función. Asimismo, la entrada de Cd genera un incremento en la síntesis de GSH (Pal y col, 2017).

Los exopolisacáridos (EPS) también confieren resistencia al Cd, disminuyendo la tasa de difusión de este metal al interior celular. En el estudio de Meesungnoen y colaboradores (2012) con *P. aeruginosa* PDMZNCd2003, se demostró que el tratamiento con Cd promovió la síntesis de EPS y esto favoreció la viabilidad, en comparación con un control al cual se le removieron los EPS utilizando  $\alpha$ -glucoamilasa.

Por último, las bacterias Gram negativas pueden expulsar al exterior celular el Cd ingresado mediante bombas de eflujo (Bruzual, 2002; Perron y col. y col., 2004; Maret y Weed., 2014; Khan y col., 2015). En algunas bacterias Gram negativas se han reportado ATPasas tipo-P, como la ZntA de *E. coli* (Binet y Poole, 2000). Sin embargo, las bombas más estudiadas, y ampliamente distribuidas en bacterias Gram negativas son aquellas pertenecientes a los sistemas *czc* de la familia de transportadores RND (resistencia, nodulación y división celular), que determinan resistencia a  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ , como CzcCBA en *P.*

*aeruginosa* y *E. coli*; y los sistemas *ncc*, que determinan resistencia a  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  (Perron y col. y col., 2004).

La bomba CzcCBA se compone de tres proteínas: CzcA que se encuentra en la cara interna de la membrana celular, y tiene la función de antiportador quimiosmótico de cationes divalentes /  $\text{H}^+$ , *czcB* que es la proteína de fusión a la membrana y, *czcC* que es la proteína de la membrana externa (Khan, 2015).

#### **1.2.2.2 Mecanismos de resistencia a Zinc en bacterias Gram negativas**

A diferencia del Cd, el Zn es un micronutriente esencial para el crecimiento bacteriano, pero a altas concentraciones ejerce un efecto tóxico (McDevitt y col. 2011), por lo que debe existir un control estricto de la entrada y salida de este metal en la célula. La entrada de Zn al citoplasma, es llevada a cabo por medio de transportadores y bombas como ZntA, una ATPasa tipo-P presente en *E. coli*. Una vez en el interior celular, si la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  excede el umbral requerido en los procesos metabólicos bacterianos, debe ocurrir la salida de este catión en pro de mantener la homeostasis. El eflujo de  $\text{Zn}^{2+}$  en bacterias Gram negativas ocurre a través de proteínas homólogas al sistema Czc descrito en la sección anterior (Pal y col. 2017). También se ha reportado bioadsorción a la pared celular y síntesis de EPS como mecanismos de resistencia a Zn (Raja y col., 2008; Meesungnoen y col., 2012).

### 1.2.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos

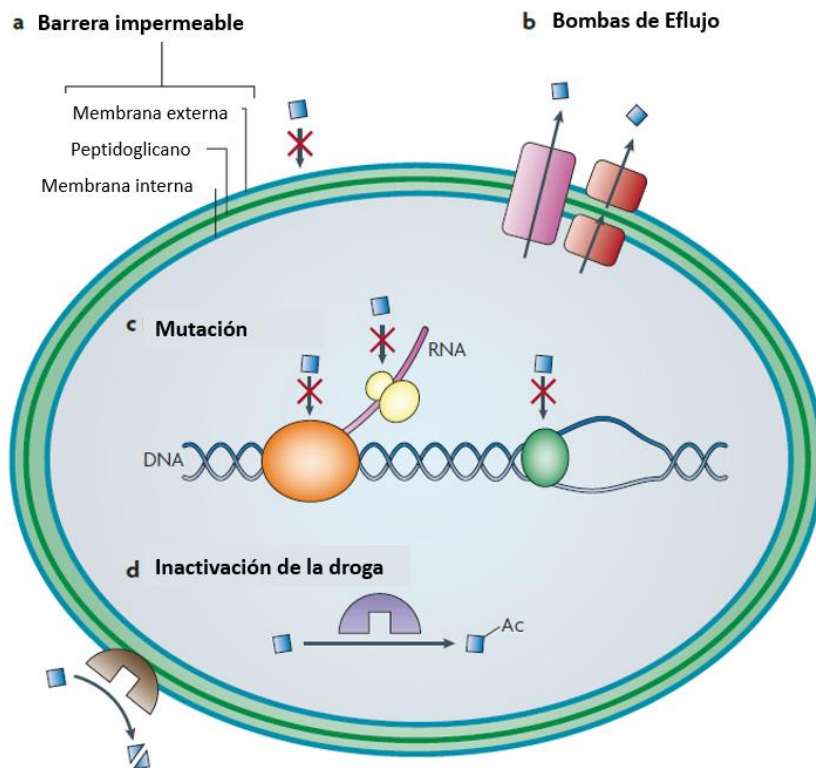
La resistencia a antibióticos puede deberse a genes presentes en el cromosoma o en elementos genéticos móviles. Se han descrito cuatro mecanismos diferentes (Figura 4).

El primero se debe a las características de la membrana de algunos tipos bacterianos, la cual puede carecer del blanco del antibiótico o impedir el paso de la droga (Figura 4.a).

El segundo consiste en la expresión de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico al exterior celular. Algunos transportadores, como los pertenecientes a la familia RND, bombean los antibióticos directamente fuera de la célula. Mientras que otros, como la superfamilia MFS (facilitadores principales), los expulsan al periplasma (Figura 4.b).

El tercer mecanismo son mutaciones que modifican la proteína blanco del antibiótico. Por ejemplo, alterando el sitio de unión a la droga, pero manteniendo intacta la funcionalidad de la proteína. En la figura 4.c se muestra el mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas, a la rifampicina y a la estreptomicina.

Por último, el cuarto mecanismo consiste en la inactivación del antibiótico por modificación covalente, como la catalizada por acetiltransferasas en aminoglicósidos, o por degradación del mismo, como sucede con las  $\beta$ -lactamasas que actúan sobre los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Figura 4.d).

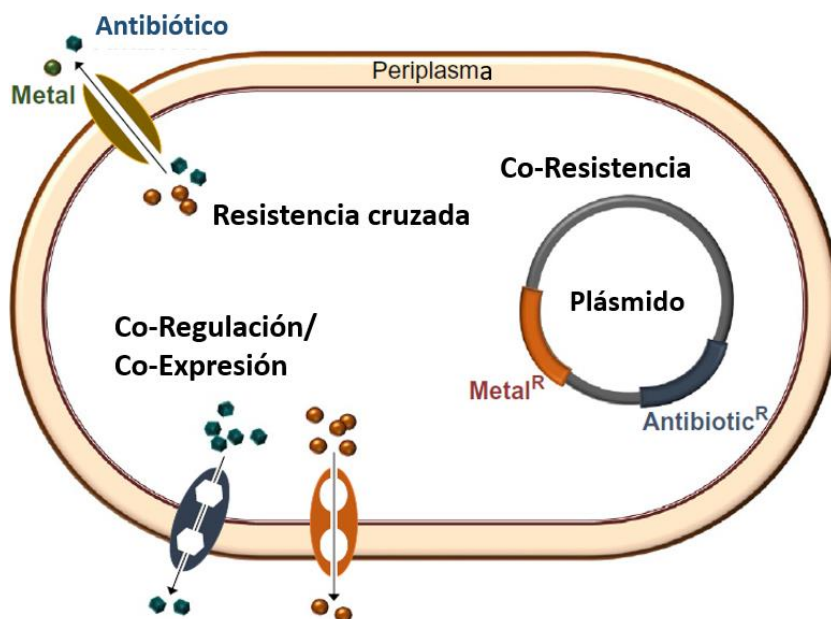


**Figura 4:** Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos. a. Barreras de impermeabilidad. b. Bombas de eflujo. Se observa en rosado la familia RND, y en rojo la superfamilia MFS. c. Mutaciones. Se muestra el mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas, a través de mutaciones en la DNA girasa (en verde); a la rifampicina, por mutaciones en la subunidad B de la RNA polimerasa (en naranja); y a la estreptomycin, por mutaciones en la proteína S12 de la subunidad ribosomal 30S (en amarillo). d. Inactivación de la droga. Se muestra la modificación mediada por acetiltransferasas (púrpura) en aminoglicósidos, y la degradación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos por efecto de  $\beta$ -lactamasas (marrón). Ac: grupo acetilo. Modificado de Allen y colaboradores (2010).

#### 1.2.4 Co-selección metales pesados – antibióticos

La Co-Selección de marcadores de resistencia a metales pesados y antibióticos, puede darse de dos formas distintas (Figura 5): Por Co-Resistencia, que ocurre cuando dos o más genes de resistencia a distintos compuestos están físicamente co-localizados en el mismo elemento genético, o por Resistencia Cruzada que ocurre cuando un mismo mecanismo, como una bomba de eflujo, confiere resistencia a diferentes compuestos simultáneamente (Pal y col., 2017).

Del mismo modo, la Co-Regulación donde múltiples mecanismos de resistencia son controlados por el mismo gen regulador, promueve el proceso de Co-Selección (Figura 5).



**Figura 5:** Mecanismos moleculares que dan lugar a la Co-Selección de genes de resistencia a metales y antibióticos. Co-Resistencia: Los genes de resistencia a antibióticos y a metales se ubican físicamente en el mismo elemento genético; por ejemplo, un plásmido. Resistencia cruzada: Un solo sistema confiere resistencia tanto a un antibiótico como a un metal. Co-Regulación / Co-Expresión: La expresión de sistemas de resistencia a metales y antibióticos está controlada por un regulador común. Modificado de Pal y colaboradores (2017).

Por otro lado, existen evidencias de que los genes de resistencia a los metales Cu, Ag, As, Co, Ni, Cd, Fe, Zn y Hg coexisten con frecuencia con los genes de resistencia para muchas clases de antibióticos, como sulfonamidas, betalactámicos, cloranfenicoles, tetraciclinas y aminoglicósidos. Además, a menudo los genes involucrados en la resistencia al Cd y al Zn están localizados en plásmidos y Co-localizados ocasionalmente junto a genes de resistencia a macrólidos y aminoglicósidos (Pal y col., 2017). Por lo que la presencia de metales pesados en el ambiente, podría promover la resistencia a estos antibióticos.

### **1.3 Conjugación bacteriana**

Algunas bacterias tienen la capacidad de transferir de forma horizontal a otros organismos, una copia de sus plásmidos o una parte de sus cromosomas integrada a moléculas plasmídicas, a través de una estructura proteica que conecta ambas células (Low, 2001). Este proceso, denominado conjugación, es unidireccional en casi todos los casos, ocurriendo de células donantes a células receptoras, aunque se ha reportado transferencia bidireccional o retrotransferencia en muy pocas ocasiones (Low, 2001).

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal con replicación autónoma, por lo general son circulares, covalentemente cerradas y doble cadena. Estos en su mayoría (con excepción de algunos megaplásmidos con un tamaño superior a 1 Mb) no presentan genes indispensables para la supervivencia de la célula huésped, pero confieren ventajas adaptativas a los microorganismos que los poseen (Norman y col., 2009).

Algunos plásmidos, llamados conjugativos, tienen la capacidad de auto transferir una copia de sí mismos a otras células de la misma especie, de distintas especies, e incluso de distintos reinos (Ilangoan y col., 2015). Mientras que los plásmidos que no presentan esta característica pueden ser no conjugativos y no transferibles cuando son incapaces de transferir una copia de sí mismos a otra célula bajo cualquier condición, o no conjugativos y movilizables cuando dependen de la maquinaria de un plásmido conjugativo ubicado en la misma célula para ser movilizados (Dionisio y col., 2015).

En función de esto, el proceso de conjugación promueve la propagación de los genes de resistencia necesarios en la supervivencia de microorganismos bajo condiciones de estrés, como la exposición a antimicrobianos, dificultando así el control de infecciones y su eliminación efectiva (Cabezón y col., 2015).

La conjugación comienza con el ensamblaje del complejo relaxosoma en el sitio OriT (origen de transferencia). El relaxosoma incluye a la proteína relaxasa y otras proteínas accesorias. La proteína relaxasa desempeña la función de catalizar el corte de una sola hebra de DNA en el sitio nic, dejando un extremo 3'-OH que actúa como cebador de la iniciación de la replicación de la cadena principal, y un único sitio de cebado para la síntesis de la cadena complementaria (Ruiz-Masó y col., 2015).

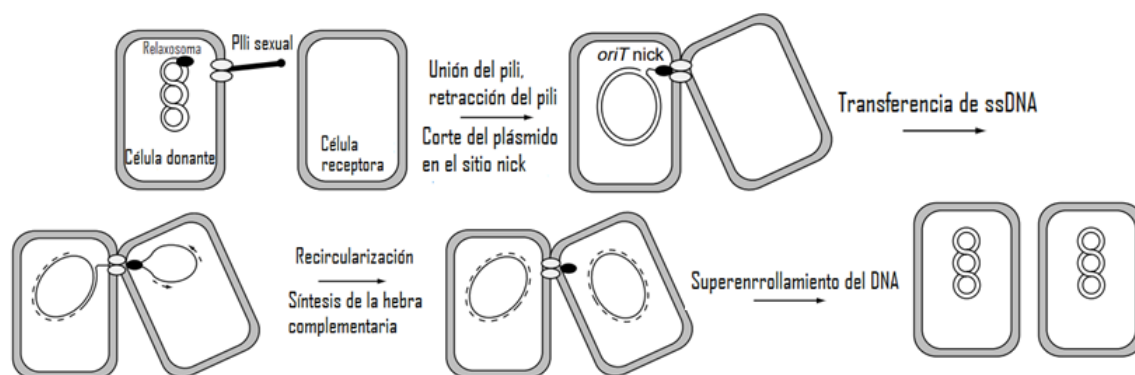
Este tipo de replicación es asimétrico para las dos hebras de DNA, lo que permite separar la replicación de las dos hebras de DNA, de manera que ocurra simultáneamente en diferentes células bacterianas. La hebra líder o principal es replicada en la célula donante y la hebra retrasada o complementaria, en la receptora (Ruiz-Masó y col., 2015).

Después del comienzo de la replicación, la enzima relaxasa permanece covalentemente unida al extremo 5' de OriT, mientras que el extremo 3'-OH libre es utilizado como cebador para la síntesis de la cadena complementaria en la célula donante. El desenrollamiento del DNA induce la formación de un complejo de nucleoproteínas llamado relaxosoma, que luego se dirige a través de una proteína de acoplamiento T4 (T4CP) a los componentes de un sistema de secreción tipo 4 (T4SS) (Wawrzyniak y col., 2017).

El T4SS consta de 4 dominios estructurales que son: el pili, el complejo del núcleo del canal, la plataforma de la membrana interna y las ATPasas hexaméricas que proveen la energía necesaria para la biogénesis del pili y el transporte del DNA (Ilangovan y col., 2015).

Como resultado, la cadena principal de DNA, junto con el relaxosoma, se transfiere a la célula receptora a través de los poros formados en la membrana por el T4SS. La ronda de replicación es completada cuando el ssDNA (DNA de cadena sencilla) transferido desde la célula donante, es reconocido por el motor de replicación de la célula receptora, y actúa como plantilla para la síntesis de la hebra complementaria (Wawrzyniak y col., 2017).

En la figura 6, se esquematiza de manera general el proceso de conjugación bacteriana.



**Figura 6:** Representación esquemática del proceso de conjugación en bacterias Gram negativas. Al inicio, una célula donante con su DNA unido al complejo relaxosoma y expresando el sistema de secreción tipo 4 (T4SS), se une a la célula receptora a través del pili. Al mismo tiempo, una hebra es cortada por el complejo relaxosoma en el sitio OriT, y es transferida junto con el complejo a la célula receptora mediante el puente de conjugación de T4SS. El DNA se recirculariza y se comienzan a sintetizar las hebras complementarias en c/u de las células. Por último, el DNA es superenrollado. Modificado de Low (2001).

## 1.4 Bacterias Gram negativas

Las diferencias de coloración que presentan las bacterias en la tinción Gram, son determinadas por la estructura y composición de la pared celular. En base a esto, se clasifican en dos grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas (Madigan y col., 2009).

La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa de peptidoglicano, que representa aproximadamente el 10 % de su pared celular, y una membrana externa de lipopolisacáridos (LPS).

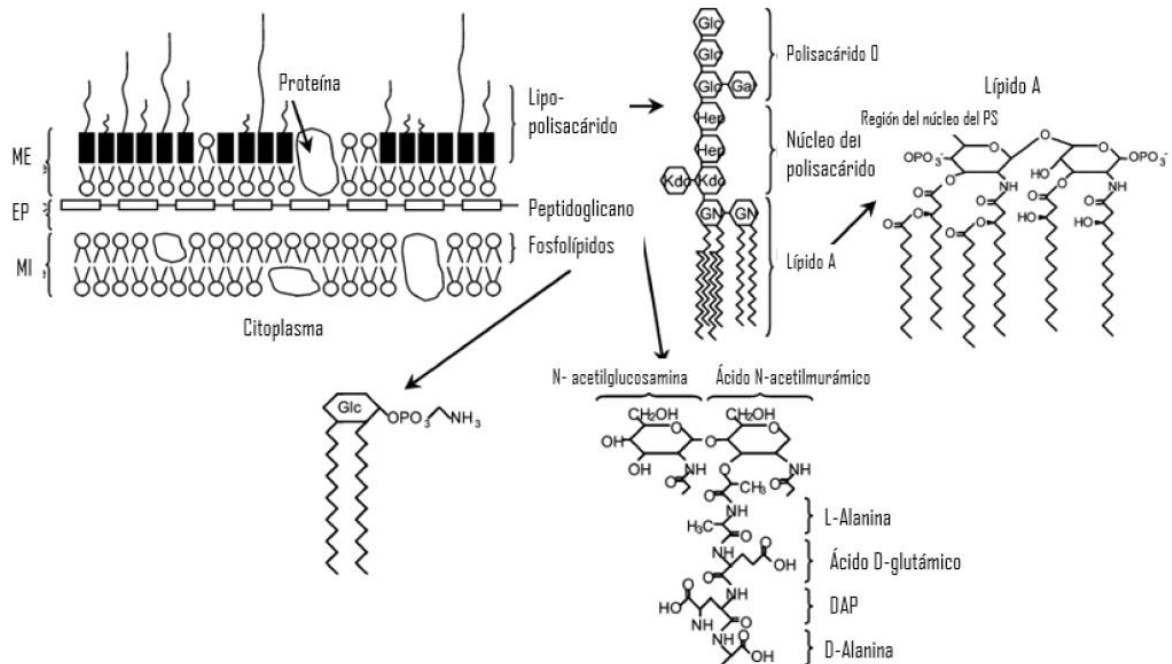
El peptidoglicano es un polímero formado por unidades estructurales llamadas tetrapéptidos de glicano, las cuales se interconectan entre sí en dos dimensiones, formando un entramado molecular que confiere rigidez y resistencia a la pared. Los tetrapéptidos de

glicano están compuestos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico conectados entre sí mediante enlaces  $\beta$ 1-4, y una cadena de 4 aminoácidos que se une al ácido N-acetilmurámico, y que en bacterias Gram negativas, son L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y ácido diaminopimélico (DAP). El peptidoglicano se ramifica por enlaces peptídicos entre el grupo amino del DAP y el carboxilo de la D-alanina terminal de otro tetrapéptido de glicano (Madigan y col., 2009).

La estructura general del LPS consta de tres regiones consecutivas desde la membrana externa hacia el exterior celular: el lípido A, el núcleo del polisacárido, y el polisacárido O. En especies de *Salmonella*, el lípido A, consta de ácidos grasos que se unen con los grupos amino de un disacárido de N-acetilglucosamina-fosfato, mediante un enlace éster. El lípido A, ubicado en la cara externa de la membrana externa, se une con el núcleo del polisacárido, mediante moléculas de cetodesoxioctonato (KDO), las cuales a su vez se unen con monosacáridos que conforman el núcleo. La siguiente estructura, el polisacárido O, está compuesto de hexosas y uno o más didesoxiazúcares, que se unen en grupos de 4 a 5, y a menudo se encuentran ramificados (Madigan y col., 2009). En la figura 7, se observa la estructura de la pared celular Gram negativa.

Dentro del grupo de bacterias Gram negativas existen cepas patógenas, las cuales por lo general presentan determinantes de resistencia a antimicrobianos.

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* son tres especies bacterianas Gram negativas con un gran número de cepas patógenas y de gran importancia clínica a nivel mundial por ser causantes de distintas enfermedades infecciosas.



**Figura 7:** Representación esquemática de la pared celular Gram negativa, con detalles de su composición. ME: Membrana externa, EP: Espacio periplasmático, MI: Membrana interna (o citoplasmática), PS: Polisacárido, DAP: Ácido diaminopimélico. Modificado de Guiné y colaboradores, 2006.

#### 1.4.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, clase Gammaproteobacteria.

Esta especie bacteriana es comensal del intestino de muchos mamíferos, así como un agente causante de importantes infecciones en humanos. Se encuentra en el ambiente por efecto de las heces de los animales en su ambiente natural, y de la descarga de aguas residuales (Jang y col., 2017). Según la OMS (2014), *E. coli* representa uno de los primeros nueve microorganismos de preocupación internacional por causar las infecciones más comunes en comunidades, hospitales y a través de la cadena trófica.

Existen tres serotipos de *E. coli*, y numerosas cepas dentro de cada serotipo con una alta diversidad genotípica (Jang y col., 2017). Las cepas pueden variar en sus características

fenotípicas como, utilización de fuentes de carbono, formación de biopelículas y resistencia a antimicrobianos. Por lo que, si bien es un organismo modelo ampliamente estudiado, aún queda información por obtener sobre cada una de sus variantes.

#### **1.4.2 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, no fermentador, perteneciente a la familia Pseudomonadaceae, clase Gammaproteobacteria. Es mótil, de vida libre, y posee una alta diversidad metabólica, lo cual le permite adaptarse con facilidad a distintas condiciones y comportarse como un patógeno oportunista.

Tiene alta prevalencia en infecciones nosocomiales, siendo causante del 10 al 15 % de las infecciones de este tipo a nivel mundial (Blanc y col., 1998). Las infecciones con este microorganismo son difíciles de tratar, pues presentan multiresistencia a diversos antimicrobianos. Hay reportes de cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos de uso común, incluyendo aminoglicósidos, cefalosporinas fluoroquinolonas y carbapenems (Moradali y col., 2017).

#### **1.4.3 *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, clase Gammaproteobacteria, encapsulado y no motil. Se encuentra en suelos y aguas superficiales, así como en superficies inanimadas asociadas a ambientes hospitalarios. Puede colonizar las mucosas de forma benigna, pero al entrar a otros tejidos causa infecciones graves como neumonía, infecciones del tracto urinario, bacteriemias, abscesos hepáticos, entre otros (Paczosa y Mecsas, 2016). Esta especie de gran importancia médica es resistente a diversos antibióticos y, por lo tanto, son difíciles de tratar.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estudios a nivel internacional

La resistencia a los metales Cd y Zn en aislados de *P. aeruginosa* de origen ambiental, y su uso potencial en biorremediación han sido ampliamente estudiadas a nivel internacional. Sin embargo, la resistencia conjunta a metales pesados y antibióticos no ha recibido la misma atención, así como tampoco la resistencia a metales pesados en aislados de origen clínico. Dentro de los trabajos en esta área, la mayoría fueron realizados con Cd, y algunos con ambos metales.

Wang y colaboradores en 1997, reportaron la capacidad de *P. aeruginosa* CW-96-1 de remover Cd del medio de cultivo empleado, con una eficiencia mayor al 99 %, utilizando concentraciones de CdCl<sub>2</sub>, entre 1 mM y 5 mM.

En el 2004 Perron y colaboradores analizaron el sistema *czcR-czcS*, como mecanismo regulador de la resistencia a Cd, Zn, Co y antibióticos carbapenémicos. Encontrando que concentraciones subletales de Zn indujeron resistencia a Zn, Cd y Co, así como también que el 20 % de los clones resistentes a imipenem, presentaron resistencia a Zn. Además, obtuvieron evidencias de que la quinasa sensora CzcS regula la expresión de genes asociados a la bomba de eflujo CzcCBA mediante su regulador, la proteína CzcR, que confiere resistencia a Cd, Zn y Co y también actúa como represor de la expresión de la porina OprD, que permite la entrada de antibióticos carbapenems a la célula, favoreciendo así la resistencia a estos antibióticos.

Luego, Raja y colaboradores en el 2008 probaron la resistencia de *P. aeruginosa* BC15 a Cd y Zn, reportando una MIC de 7 mM para Cd y superior a 20 mM para Zn en agar LB.

Sinha y Kumar en el 2009, reportaron resistencia a 8 mM de CdCl<sub>2</sub> en agar nutritivo y capacidad de bioacumulación de *P. aeruginosa* KUCd1. Además, demostraron que la entrada de Cd al interior celular fue variable en función de la fase de crecimiento en la cual se encontrase la cepa, provocando una mayor bioacumulación durante la fase estacionaria.

Malik y Asem (2010), evaluaron la resistencia a Cd y Zn de 144 aislados ambientales de *Pseudomonas* spp. El 70 % de los aislados fue resistente a Cd en un rango de MICs entre 400 µg/mL y 3200 µg/mL, mientras que el 91,6 % de los aislados fue resistente a Zn, en un rango de MICs entre 200 µg/mL y 3200 µg/mL. Por otro lado, presentaron resistencia a distintos tipos de antibióticos, y además transfirieron por conjugación la resistencia a Cd y Zn, utilizando una cepa de *E. coli* como receptora.

Por último, en el estudio de Deredjian y colaboradores (2011) determinaron el fenotipo de resistencia a varios metales pesados y antibióticos, en aislados de origen clínico y aislados medioambientales. Obtuvieron que los aislados de origen ambiental fueron más resistentes a Cd y Zn, mientras que los aislados clínicos fueron más resistentes a Cu y Hg. Sin embargo, no encontraron una correlación entre la resistencia a metales pesados y antibióticos.

Todo esto da un indicio de que, si bien la bibliografía reporta a este organismo como resistente a los metales Cd y Zn, su fenotipo de resistencia varía entre cepas, lo cual resalta la importancia de seguir caracterizando a esta especie.

Para *E. coli*, existen algunos trabajos donde se evalúa su fenotipo de resistencia y su capacidad de bioacumulación para Cd y Zn. Por otro lado, al igual que con *P. aeruginosa*, son escasos los trabajos donde se evalúa resistencia conjunta a estos metales y, antibióticos.

En el estudio de Karbasizaed y colaboradores (2003), se compararon los patrones de resistencia a metales pesados entre aislados de pacientes con infecciones nosocomiales y de personas sanas, y se encontró que la mayoría de las cepas aisladas del ambiente hospitalario fueron más resistentes a los metales. Asimismo, se determinó la presencia de plásmidos conjugativos con genes de resistencia a antibióticos y metales pesados.

En el trabajo de Chen y colaboradores en el 2015 con *E. coli* DH5 $\alpha$  se demostró que es posible inducir resistencia a tetraciclina luego de la exposición a 2 mM de Cu y 0,625 mM de Zn.

Ese mismo año, Khan y colaboradores caracterizaron el fenotipo de resistencia a algunos metales pesados en *E. coli* P4 aislada de aguas residuales. Obtuvieron una MIC para Cd de 10,6 mM y para Zn de 4,4 mM. Por otro lado, se demostró que la bioadsorción de estos metales varía en función de la temperatura y el pH.

Respecto a *K. pneumoniae*, hay algunas investigaciones acerca de su capacidad de resistencia a Cd, pero en Zn, son escasas. En el trabajo de Pramanik y colaboradores (2017), se reportó la MIC para Cd de tres aislados de *K. pneumoniae* MCC 3091 en un rango superior a 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en agar DM, proponiendo como causa de esto, procesos de bioacumulación, evidenciados por espectroscopía de absorción atómica y microscopía electrónica de transmisión.

En otro trabajo, de Khan y colaboradores en el 2015, utilizando cepas aisladas de aguas residuales, reportaron resistencia a 13,3 mM de Cd y 17 mM de Zn en caldo MS, así como capacidad de bioacumulación y bioadsorción. También obtuvieron como temperatura óptima de crecimiento, y de bioacumulación 37 °C.

## 2.2 Estudios a nivel nacional

A nivel nacional son pocos los estudios en resistencia bacteriana a Cd y a Zn, y la información respecto a resistencia conjunta a metales pesados y antibióticos en aislados clínicos es más escasa. En Venezuela, el trabajo de Bruzual (2002), reportó una MIC en medio LB, de 3 mM para Zn y 2,5 mM para Cd en cepas de *E. coli*.

Alonso y colaboradores en el 2005, demostraron que el 90 % de las bacterias aisladas del Embalse Pao-Cachinche, presentaron resistencia al menos a cuatro antibióticos ensayados, y más del 70 % fueron resistentes al menos a un metal tóxico. Los resultados revelaron la presencia de plásmidos en más del 80 % de las cepas analizadas, a los cuales se les demostró la capacidad de transferencia. También, en el Embalse La Mariposa se identificaron 25 aislados, los cuales presentaron resistencia a un promedio de 4 antibióticos, con predominio de resistencia a aminoglicósidos. Más del 90 % de estas cepas presentaron resistencia al menos a 3 antibióticos ensayados.

Otros estudios de resistencia a metales pesados incluyen los de Zapata (2015) y Sanabria (2015), utilizando vanadio en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente. Zapata obtuvo resistencia de todos los aislados para 200 mM de  $\text{NaVO}_3$  y transmisión de este fenotipo por conjugación en un 91,6 % de las cepas, con una frecuencia de transferencia relativamente alta ( $8,46 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-3}$  células transconjugantes / células donantes).

Por otro lado, Sanabria observó diferencias en la viabilidad de las cepas en función de la fase de crecimiento. La mayor viabilidad se obtuvo con 50 mM de vanadio en la fase estacionaria. También logró transferir el fenotipo de resistencia a *E. coli* mediante conjugación, con una frecuencia de transferencia relativamente alta:  $1,34 \times 10^{-2}$  y  $7,78 \times 10^{-2}$  células transconjugantes / células donantes. Además, obtuvo co-transferencia para marcadores de resistencia a distintos antibióticos.

Por otro lado, Bazdikian (2013) evaluó la resistencia a metales pesados, en aislados de *E. coli* provenientes de infecciones del tracto urinario. Reportó que el 24 % de los aislados fueron resistentes a 2 mM de Co y el 46 % a 5mM de Cu. Además, estos fueron capaces de transferir dichos genes de resistencia por conjugación.

Por último, Gómez y colaboradores (2013), evaluaron la resistencia a mercurio y múltiples antibióticos en cepas bacterianas aisladas a partir de una laguna de cola, conteniendo una alta concentración de Hg soluble. Además, fueron capaces de transferir por conjugación marcadores de resistencia a metales y antibióticos, a cepas potencialmente patógenas para animales y el hombre. Estos resultados son relevantes desde el punto de vista de salud pública, especialmente en vista del riesgo potencial de la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos entre las bacterias ambientales de vida libre, y bacterias potencialmente patógenas para el hombre.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La propagación masiva de bacterias que presentan genes de resistencia a antibióticos es un problema de salud pública a nivel mundial, donde la presencia de los determinantes de resistencia en elementos genéticos móviles ha tenido especial relevancia. Asimismo, las evidencias sugieren que el incremento en las concentraciones de metales pesados en el ambiente es capaz de promover la selección de los marcadores de resistencia a antibióticos en las comunidades de microorganismos.

El Cd y el Zn son dos metales pesados con propiedades químicas similares que se encuentran generalmente asociados en el ambiente como contaminantes, y cuya concentración ha aumentado en los últimos años. Así como también han aumentado los reportes de Co-resistencia bacteriana a estos metales y antibióticos.

En este sentido, existe la posibilidad de que algunos aislados de cepas patógenas, hayan obtenido la resistencia a antibióticos como consecuencia de un proceso de selección provocado por la contaminación con metales pesados, y específicamente con Cd y Zn, y que, debido a los mecanismos de transferencia horizontal, los genes asociados hayan sido diseminados en las poblaciones bacterianas.

Por otro lado, debido a que existen cepas patógenas de humanos y otros animales que pueden encontrarse en el ambiente, estas estarán sometidas a distintas temperaturas, y es importante conocer si este factor es capaz de ejercer algún efecto sobre la resistencia de los microorganismos.

Debido a lo explicado anteriormente, es necesario estudiar y determinar los factores que contribuyen a la aparición y propagación de los genes de resistencia a antimicrobianos, para formular prácticas y políticas de salud pública que permitan combatir esta problemática.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar el fenotipo de resistencia al cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) y cloruro de cinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) en aislados bacterianos y su capacidad de transferencia por conjugación.

### Objetivos específicos

- Determinar la viabilidad de aislados bacterianos en presencia de distintas concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ .
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de aislados bacterianos en presencia de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ .
- Evaluar la capacidad de transferencia horizontal de la resistencia a  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{CdCl}_2$  en los distintos aislados bacterianos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cepas bacterianas

Los aislados utilizados fueron obtenidos a partir de punciones provenientes de ambientes hospitalarios o de pacientes. Estos pertenecen a tres especies bacterianas Gram negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Además, fueron previamente caracterizados en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos (LBPB), presentando resistencia a múltiples antibióticos.

También se utilizó *E. coli* J-53 con pMIP233, n° 144 del CVCM, con resistencia reportada para Cd y Zn (Bruzual, 2002), y *P. aeruginosa* MPAO1, caracterizada previamente en el LBPB.

En la tabla I, se presentan los aislados empleados, su procedencia y fecha de colección, su perfil de resistencia a antibióticos y la referencia bibliográfica.

#### 5.1.2 Cepas control

- Control negativo para ensayos de viabilidad en presencia de metales pesados, y cepa receptora para los ensayos de conjugación: *E. coli* K12 J62-2 n° 131 del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) de genotipo: F<sup>-</sup>, RIF<sup>+</sup>, his<sup>-</sup>, lac<sup>-</sup>, pro<sup>-</sup>, tri<sup>-</sup>; F<sup>-</sup>, y fenotipo F<sup>-</sup>, RIF<sup>R</sup>, His<sup>-</sup>, Pro<sup>-</sup>, Tri<sup>-</sup> (CVCM, 2009).

**Tabla I:** Aislados bacterianos utilizados

Especie	Cepa	Perfil de Resistencia	Procedencia	Centro Asistencial	Referencia
<i>E. coli</i>	3438	AMP CEP CIP GEN PIP SXT	Urocultivo de paciente con ITU	Centro Médico Docente La Trinidad (CMDLT) 2006 - 2007	Angiolillo (2007)
	3920	AMP CEP CIP GEN PIP SXT			
	3663	SXT			
<i>P. aeruginosa</i>	PB12'	AMK CIP CRO CTX GEN LVX STR TCY TOB	Secreción Traqueal de paciente con infección nosocomial	Hospital Universitario de Caracas (HUC) 2007 - 2008	Chalbaud (2010)
	N242	AMK CRO CTX GEN STR TCY TOB	Jabonera		
	U387c	CTX FEP STR TCY	Carro de cura		
<i>K. pneumoniae</i>	KP15	AMK AMP ATM CAZ CHL CRO CTX FEP GEN KAN NET OFX TCY TOB TZP	Sangre de paciente con infección nosocomial	Servicio Autónomo Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá (SAHUAPA) 2003 - 2004	Guzmán (2006)
	KP20	AMP ATM CAZ CRO CTX GEN TOB			
	KP11	AMP AMK ATM CAZ CHL CRO CTX FEP GEN KAN NET TOB TZP			

AMK: Amikacina, AMP: Ampicilina, ATM: Aztreonam, CAZ: Ceftazidima, CEP: Cefalotina, CHL: Cloranfenicol, CIP: Ciprofloxacina, CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima, FEP: Cefepime, GEN: Gentamicina, KAN: Kanamicina, LVX: Levofloxacina, NET: Netilmicina, OFX: Ofloxacina, PIP: Piperacilina, STR: Estreptomycin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, TCY: Tetraciclina, TOB: Tobramicina, TZP: Piperacilina-Tazobactam.

## 5.2 Medios de cultivo

Para los ensayos en medio líquido, y para la mezcla de conjugación se utilizó Caldo Nutritivo (CN) CM0001 marca OXOID. La composición del CN empleado fue: 1 g de extracto de carne, 2 g de extracto de levaduras y 5 g de peptonas por 1 L de medio.

Para la recuperación de las cepas, los ensayos en medio sólido, los controles de fenotipo, la siembra de transconjugantes obtenidas en el proceso de conjugación y las pruebas de co-transferencia, se utilizó agar nutritivo (AN) con extracto de levaduras. Este medio fue preparado, agregando 15 g de agar disuelto por cada litro de CN.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave a 120 °C, por 15 min a 15 lb de presión.

### 5.2.1 Suplementos de los medios de cultivo

Las sales CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> marca Sigma Aldrich fueron utilizadas como fuentes de cationes Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> para suplementar los medios de cultivo, ya que son solubles en agua y en los medios de cultivo mencionados.

Para definir las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> a añadir al medio líquido, en las tres temperaturas del estudio, se tomaron algunas MICs reportadas en la bibliografía. En los casos con múltiples MICs reportadas, se calculó el promedio de las mismas (Tabla II).

**Tabla II:** Concentraciones mínimas inhibitorias reportadas para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*

<b>Especie</b>	<b>[CdCl<sub>2</sub>] (mM)</b>	<b>Referencia</b>	<b>[ZnCl<sub>2</sub>] (mM)</b>	<b>Referencia</b>
<i>E. coli</i>	2,5	Bruzual (2002)	3,0	Bruzual (2002)
<i>P. aeruginosa</i>	5,6	Kais y col. (2017)	20,0	Raja y col. (2008)
<i>K. pneumoniae</i>	15,0	Pramanik y col. (2017)	17,0	Khan y col. (2015)

Para definir las concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> a utilizar a las tres temperaturas del estudio en medio líquido, se partió de MICs reportadas en la bibliografía (Tabla II). En los primeros ensayos de viabilidad utilizando las MICs reportadas no se observó crecimiento en las placas de AN, por lo que se procedió a disminuir las concentraciones en los ensayos posteriores. Aquellas concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> donde se comenzó observar crecimiento, se utilizaron luego a las tres temperaturas del estudio (Tabla III).

**Tabla III:** Concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> utilizadas en los ensayos a 25 °C, 37 °C y 42 °C

<b>Especie</b>	<b>Aislado</b>	<b>[ZnCl<sub>2</sub>] (mM)</b>
<i>E. coli</i>	J62-2	0,5
	J53	1,5
	3438	1,5
	3920	2,0
	3663	1,5
<i>P. aeruginosa</i>	MPAO1	13,5
	PB12'	17,0
	N242	7,0
	U387c	16,5
<i>K. pneumoniae</i>	KP15	3,0
		7,0
	KP20	1,5
	KP11	3,0

Por otro lado, los antibióticos utilizados fueron seleccionados de acuerdo a los perfiles de resistencia reportados en la bibliografía para cada aislado (Guzmán, 2006; Angiolillo, 2007, Chalbaud, 2010; Sanabria, 2015). Las soluciones de los antibióticos fueron almacenadas a -20 °C, y se agregaron a los medios de cultivo de acuerdo a la tabla IV.

**Tabla IV:** Concentraciones de los antibióticos utilizados

<b>Antibiótico</b>	<b>Solvente</b>	<b>Concentración</b>	
		<b>STOCK (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>USO (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>
Ampicilina	Agua destilada	50	100
Rifampicina	Metanol	30	100

STOCK, concentración de los antibióticos almacenados a -20 °C. USO, concentración final de los antibióticos en el medio de cultivo.

### **5.3 Ensayos de viabilidad**

Los términos viabilidad y cultivabilidad son utilizados de forma indistinta por muchos autores, como un término operacional para aquellas células que pueden crecer a niveles detectables en medios de cultivo en condiciones estándar de laboratorio (Barer y Harwood, 1999). Sin embargo, se han reportado algunos estados fisiológicos donde las células bacterianas se encuentran aparentemente intactas y con procesos metabólicos en curso, pero dejan de ser cultivables en los medios de cultivo donde habitualmente crecen. Algunos autores se refieren a esto como células viables, pero no cultivables (Kell y col., 1998). En esta investigación el término viable será utilizado de aquí en adelante para referirse a aquellas células que sean viables y cultivables.

#### **5.3.1 Reactivación de los aislados**

Los aislados se encontraban almacenados en punciones de AN a temperatura ambiente. Para su reactivación, se le agregó a cada uno 200  $\mu$ L de CN y se colocaron en incubación por 24 h, a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo y trabajando en esterilidad, se sembraron por agotamiento en placas de AN suplementadas con RIF, para *E. coli* J62-2, o con AMP para el resto de los aislados. Luego, se colocaron en incubación a 37 °C por 24 h, y se observaron las colonias típicas de cada aislado.

#### **5.3.2 Pre-cultivo de los aislados**

Para realizar los precultivos en fase estacionaria de crecimiento, se inocularon por separado 3 mL de CN estéril con una colonia aislada de c/u de los aislados recuperados. Se incubaron los tubos a 37 °C por 24 h.

### 5.3.3 Viabilidad celular inicial

Se estimó el título bacteriano inicial mediante turbidimetría, y se verificó que los aislados se encontraran en la fase estacionaria de crecimiento. Para ello, se tomaron 150  $\mu\text{L}$  de los precultivos y se procedió a medir la DO a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Eppendorf Biophotometer®.

Previamente, para obtener una relación proporcional entre la DO y el recuento directo de colonias viables en placas, se empleó el método de titulación en gota en paralelo con la turbidimetría. La titulación en gota se realizó haciendo diluciones seriadas de los precultivos en solución salina al 0,85 % (m/v), desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-7}$ , sembrando gotas de 10  $\mu\text{L}$  por quintuplicado, en placas de AN. Luego, estas se incubaron por 24 h, a 37 °C. Para el conteo de colonias viables, se tomaron en cuenta los sectores con más de 5 unidades formadoras de colonias (UFC) y menos de 50 UFC. El título bacteriano se calculó con la Ecuación I.

$$\text{Título (UFC.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{UFC} \times \text{FD}}{\text{Volumen de siembra (mL)}}$$

**Ecuación I:** Título bacteriano. UFC: Unidades formadoras de colonias. FD: Factor de dilución

### 5.3.4 Viabilidad celular en medio líquido en presencia de sales de metales pesados

Una vez realizada la estimación de la viabilidad inicial por turbidimetría, se procedió a evaluar el efecto del  $\text{CdCl}_2$  y el  $\text{ZnCl}_2$  sobre la viabilidad de los aislados bacterianos a distintas temperaturas y concentraciones.

Para ello, se colocaron 970  $\mu\text{L}$  de los precultivos de cada aislado en tubos de microcentrífuga, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de las soluciones de  $\text{CdCl}_2$  o  $\text{ZnCl}_2$  preparadas a las concentraciones indicadas en las tablas II y III, según fuese el caso y, se incubaron durante 48 h a 25 °C, 37 °C y 42 °C. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se utilizó el método de titulación en gota para obtener el título bacteriano. La siembra se realizó en placas de AN,

y en placas de AN suplementado con CdCl<sub>2</sub> o ZnCl<sub>2</sub> a las mismas concentraciones usadas para suplementar el CN.

Asimismo, se determinó si el efecto de los metales fue bacteriostático o bactericida al observar el crecimiento en las placas luego de la incubación. Si la acción del CdCl<sub>2</sub> o del ZnCl<sub>2</sub> es bacteriostática, los microorganismos deberían ser viables y tener una reducción de su viabilidad menor al 99,9 %, al retirar el tratamiento y sembrar en placas de AN, pero tener un título más bajo en las placas de AN suplementado con el metal. Por el contrario, si la acción es bactericida, la reducción de la viabilidad será superior al 99,9 %, o no habrá crecimiento de los aislados en las placas.

Al mismo tiempo como ensayo control, se incubaron 970 µL de los precultivos en ausencia de las sales de metales pesados, durante 48 h a 25 °C, 37 °C y 42 °C. De igual manera, se realizó el método de titulación en gota para obtener el título final, y comparar con el título en presencia de las sales de Cd y Zn.

Las siembras se hicieron por quintuplicado, con dos réplicas por cada experiencia. De tal forma de obtener un n = 10 para cada experimento. Con estos datos, se calculó la fracción de supervivencia de los aislados (FS), y se realizaron los análisis estadísticos correspondientes.

La FS representa la relación entre la viabilidad bacteriana bajo un tratamiento dado, respecto a un control bajo las mismas condiciones, pero en ausencia del tratamiento (Ecuación II).

$$FS = \frac{UFC. mL^{-1} TRATAMIENTO}{UFC. mL^{-1} CONTROL}$$

**Ecuación II:** Fracción de supervivencia. UFC: Unidades formadoras de colonias.

Además, se calculó el porcentaje de reducción de la viabilidad en cada condición estudiada (Ecuación III), para estimar una concentración mínima bactericida (MBC). Donde la MBC es la concentración más baja de un antimicrobiano que reduce la viabilidad de un inóculo bacteriano en más del 99,9 % (Goins, 2017).

$$\% Rx = [1 - (UFC \text{ tratamiento} / UFC \text{ control})] \times 100 \%$$

**Ecuación III:** Porcentaje de reducción de la viabilidad (% Rx). El cociente UFC tratamiento / UFC control representa la fracción de supervivencia (FS). UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

#### 5.4 Análisis Estadístico

Para determinar si las diferencias observadas entre la viabilidad de los aislados bacterianos en presencia de CdCl<sub>2</sub>, y los controles en ausencia de la sal, fueron estadísticamente significativas, se realizó un ANOVA multifactorial, con las medias de los títulos bacterianos.

Asimismo, para determinar si hubo diferencias en la viabilidad de las cepas de cada especie a las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> ensayadas y las tres temperaturas, se realizó un ANOVA multifactorial, con las medias de la FS, y el análisis final del contraste de hipótesis entre las diferencias de medias, se realizó con la prueba LSD de Fisher.

Para determinar si las diferencias entre las medias de los títulos bacterianos en presencia y ausencia de ZnCl<sub>2</sub> eran estadísticamente significativas, se realizó la prueba no paramétrica “U” de Mann – Whitney por aislado y por temperatura, debido a que el diseño experimental fue de tipo no balanceado.

Luego, para determinar si las diferencias en la viabilidad a las tres temperaturas del estudio fueron estadísticamente significativas, se realizó la prueba no paramétrica de

diferencia de medias de Kruskal – Wallis, para los valores de las medias de la FS. Estos resultados se analizaron mediante los valores de p obtenidos.

El análisis de la tabla ANOVA, se realizó en función del valor de probabilidad resultante (p) y del estadístico F de Fisher. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo para rechazar la hipótesis nula de no diferencia de medias. Es decir, que alguna de las medias de los tratamientos es distinta de las demás. Por otro lado, el estadístico F permitió comparar la magnitud del efecto de los distintos factores involucrados en el diseño experimental. Por ejemplo, valores de F más altos para la variable  $\text{CdCl}_2$ , que para la variable temperatura, implican que el  $\text{CdCl}_2$  tuvo una mayor influencia sobre la viabilidad, en comparación con la temperatura.

Todos los análisis se realizaron en el programa Statistica®, utilizando 95 % de confianza.

## **5.5 Ensayos de conjugación**

Para efectuar las pruebas de transferencia de la resistencia a Cd y Zn mediante conjugación, se utilizó una modificación del protocolo de Sanabria, 2015.

Una vez obtenidos los resultados de los ensayos de viabilidad en medio líquido, se determinó su viabilidad en medio sólido para establecer las concentraciones a usar en los ensayos de conjugación.

### 5.5.1 Viabilidad celular en medio sólido

Se realizaron precultivos de los aislados seleccionados en fase estacionaria de crecimiento, y de *E. coli* J62-2. Se sembraron por agotamiento en placas de AN suplementado con las concentraciones indicadas en la tabla V. Se incubaron por 24 h a 37 °C y se observó presencia y ausencia de crecimiento.

Se estimaron las MIC con los resultados obtenidos. Donde las MICs son aquellas concentraciones donde no se observó crecimiento visible en las placas.

Aquellos aislados que hayan presentado una MIC superior al control negativo serán reportados como resistentes.

**Tabla V:** Concentraciones de CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> utilizadas en los ensayos de viabilidad en medio sólido.

[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM)	[CdCl <sub>2</sub> ] (mM)
ND	0,5
ND	1,0
ND	2,0
1,0	2,5
3,0	5,6

ND: No determinado.

### 5.5.2 Control de fenotipo

Luego de los ensayos de viabilidad en medio sólido, se seleccionaron como cepas donantes, aquellos aislados que fueron viables a alguna de las concentraciones que se muestran en la tabla 5, respecto a *E. coli* J62-2 que no lo fue.

Se les aplicó un control de fenotipo a las cepas donantes y a la cepa receptora, sembrando los aislados por agotamiento en placas de AN suplementado con RIF, AN suplementado con AMP, AN suplementado AMP y con 1 mM o 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> y AN suplementado con AMP y 1 mM de ZnCl<sub>2</sub>. Luego, se incubaron las placas a 37 °C por 24 h.

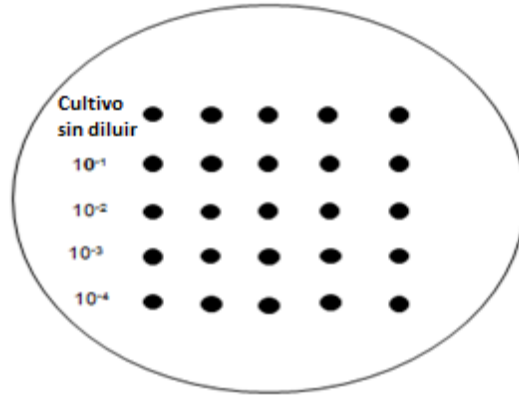
### 5.5.3 Mezcla de Conjugación

A continuación, se tomó una colonia aislada de cada cepa, se inocularon 2 mL de CN por separado para realizar precultivos de cada aislado, y se colocaron en agitación constante por 24 h a 37 °C. Luego, se realizó una dilución 1/100 de las cepas donantes y una dilución 1/50 de la cepa receptora, para un volumen final de 3 mL en CN.

Se colocaron en agitación constante a 37 °C hasta que las cepas (donantes y receptora) alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, aproximadamente a 0,4 unidades de DO.

Una vez alcanzada la fase exponencial se prepararon las mezclas de conjugación. Para ello, se agregaron 0,1 mL de la cepa donante respectiva, y 0,4 mL de la cepa receptora, a 0,5 mL de CN en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL y, se incubaron por 24 h a 37 °C. También, se realizó la titulación de las cepas donantes, mediante el método de titulación en gota, para el cálculo de la frecuencia de conjugación (Ecuación IV).

Luego, se realizaron diluciones seriadas de las mezclas de conjugación, y se sembraron en placas de AN, AN suplementado con RIF y AMP, AN suplementado con RIF, AMP y 0,5 / 1 mM de CdCl<sub>2</sub>, y AN suplementado con RIF, AMP y 1 mM de ZnCl<sub>2</sub> (Figura 8). Se incubaron por 24 h a 37 °C. Para el cálculo del título, se tomaron en cuenta los sectores con más de 5 UFC y menos de 50 UFC.



**Figura 8:** Patrón de siembra en placas de AN y AN suplementado, para ensayos de conjugación. Se realizaron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y se sembró el cultivo puro sin diluir. Se sembraron gotas de  $10 \mu\text{L}$  por quintuplicado.

Por último, con el título donante y el título transconjugante, se calculó la frecuencia de conjugación (Ecuación IV).

$$\text{Frecuencia de conjugación} = \frac{\text{UFC. mL}^{-1} \text{TRANSCONJUGANTE}}{\text{UFC. mL}^{-1} \text{DONANTE}}$$

**Ecuación IV:** Frecuencia de Conjugación.

Como control positivo de la conjugación, se utilizaron las cepas *E. coli* 3574 (Angiolillo, 2007), y *K. pneumoniae* KP14 (Guzmán, 2006) con AMP como marcador de selección.

#### 5.5.4 Pruebas de Co-transferencia

Las transconjugantes se sembraron por agotamiento en AN + RF + AMP. Posteriormente, se tomaron colonias transconjugantes y se inocularon 3 mL de CN. Se incubó a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta llegar a 0,9 unidades de DO aproximadamente.

Luego, utilizando un hisopo mojado con el cultivo, se inocularon placas de AN en todas las direcciones para promover la formación del césped bacteriano, según el método de difusión en disco de Kirby-Bauer.

Finalmente, se colocaron discos de antibióticos correspondientes a aquellos a los cuales, las cepas donantes fueron resistentes en estudios previos (Tabla VI). Las placas se incubaron por 24 h a 37°C. Luego del tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento.

Se determinó la co-transferencia de otros marcadores antimicrobianos, según lo establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y Laboratorios (CLSI, 2006).

**Tabla VI.** Antibióticos utilizados en las pruebas de co-transferencia.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g. disco}^{-1}</math>)</b>
AMK	30
CTX	30
STR	10
TCY	30
TOB	10

## 6. RESULTADOS

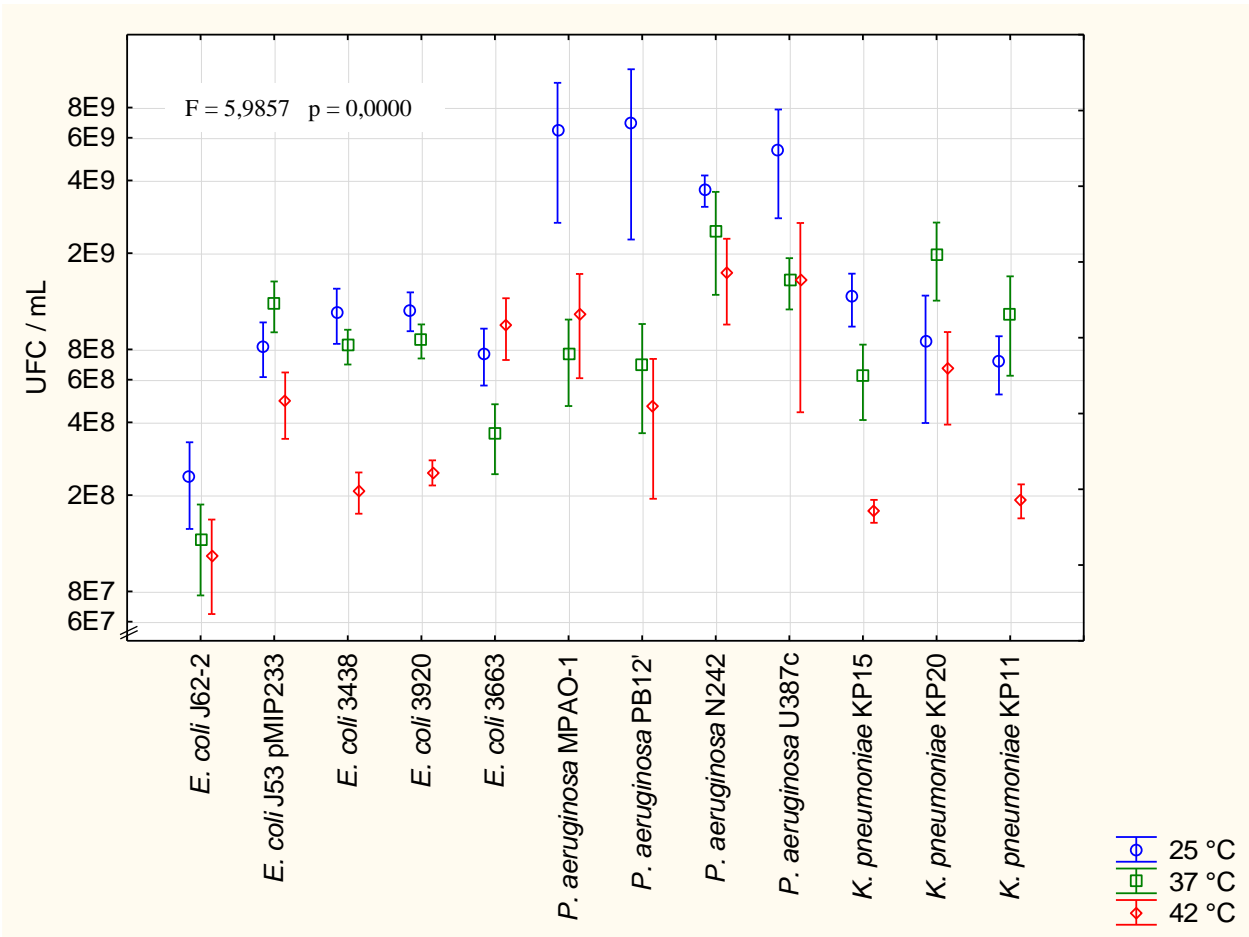
### 6.1 Ensayos de viabilidad en medio líquido

#### 6.1.1 Ensayos de viabilidad en función de la temperatura de incubación

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los aislados bacterianos en ausencia de sales de metales pesados. Las temperaturas utilizadas fueron 25 °C, 37 °C y 42 °C y el tiempo de incubación fue de 48 h.

La temperatura de incubación a la cual se observó mayor viabilidad fue 25 °C. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el título bacteriano de la mayoría de los aislados a las tres temperaturas de incubación ( $p > 0,05$  en la prueba LSD). Todos los aislados pertenecientes a la especie *P. aeruginosa*, presentaron diferencias significativas en el título bacteriano a 25 °C con respecto a los demás, a excepción de *P. aeruginosa* N242 a 37 °C. También, algunos aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* presentaron un título más bajo a 42 °C ( $p < 0,05$  en la prueba LSD).

En la figura 9 se muestra la media del título bacteriano para cada aislado a las tres temperaturas de incubación.



**Figura 9:** Título bacteriano de los aislados en fase de crecimiento estacionaria, incubados a 25 °C, 37 °C y 42 °C. Algunos aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*, presentaron un título más bajo a 42 °C, mientras que todos los aislados de *P. aeruginosa* presentaron un título más alto a 25 °C. Se reporta la media aritmética ± el intervalo de confianza al 95 % en escala logarítmica, para la prueba LSD de Fisher, con un n = 20.

### 6.1.2 Ensayos de viabilidad en presencia de CdCl<sub>2</sub>

Se realizaron ensayos de viabilidad en presencia de 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub> para los aislados de *E. coli*, 5,6 mM para los aislados de *P. aeruginosa* y 15 mM para los aislados de *K. pneumoniae*, incubando a 25 °C, 37 °C y 42 °C, durante 48 h. Para ello, se determinó el título en placas de AN y placas de AN suplementadas con CdCl<sub>2</sub> a la concentración que correspondiese según la especie. Como ensayo control se incubaron cultivos de todos los aislados a las mismas temperaturas, en ausencia de CdCl<sub>2</sub> y se determinó el título sembrando en placas de AN.

Se observó reducción de la viabilidad para todas las cepas, a las tres temperaturas y las tres concentraciones de CdCl<sub>2</sub> estudiadas, en comparación con los controles en ausencia de tratamiento. Los resultados de los títulos obtenidos en placas de AN se reportan en la tabla VII.

El título bacteriano obtenido en las placas de AN suplementadas con CdCl<sub>2</sub> fue inferior a  $1,00 \times 10^4 \pm 0,00 \times 10^1$  para todas las cepas, a las tres temperaturas y las tres concentraciones, indicando que hubo una reducción de la viabilidad superior al 99,9 %, por lo que se omiten estos resultados.

**Tabla VII:** Título bacteriano para cada aislado a las 48 h de incubación a 25 °C, 37 °C y 48 °C, creciendo en ausencia y en presencia de CdCl<sub>2</sub>.

Aislado	UFC.mL <sup>-1</sup> Control en ausencia de CdCl <sub>2</sub>			UFC.mL <sup>-1</sup> Tratamiento con CdCl <sub>2</sub>			[CdCl <sub>2</sub> ] (mM)
	Temperatura (°C) ± DS			Temperatura (°C) ± DS			
	25	37	42	25	37	42	
<i>E. coli</i> J62-2	4,05x10 <sup>8</sup> ± 1,44x10 <sup>8</sup>	8,50x10 <sup>7</sup> ± 6,11x10 <sup>7</sup>	1,91x10 <sup>8</sup> ± 8,29x10 <sup>7</sup>	1,27x10 <sup>6</sup> ± 1,01x10 <sup>6</sup>	1,05x10 <sup>5</sup> ± 7,93x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	2,5
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	3,68x10 <sup>9</sup> ± 4,52x10 <sup>8</sup>	7,50x10 <sup>8</sup> ± 1,72x10 <sup>8</sup>	8,10x10 <sup>8</sup> ± 1,45x10 <sup>8</sup>	4,54x10 <sup>6</sup> ± 6,55x10 <sup>5</sup>	8,30x10 <sup>5</sup> ± 2,36x10 <sup>5</sup>	2,55x10 <sup>5</sup> ± 5,72x10 <sup>4</sup>	2,5
<i>E. coli</i> J53	6,20x10 <sup>8</sup> ± 2,86x10 <sup>8</sup>	8,41x10 <sup>8</sup> ± 4,02x10 <sup>8</sup>	7,80x10 <sup>8</sup> ± 1,81x10 <sup>8</sup>	8,80x10 <sup>4</sup> ± 8,30x10 <sup>4</sup>	2,26x10 <sup>5</sup> ± 3,60x10 <sup>4</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	2,5
<i>E. coli</i> 3438	6,70x10 <sup>8</sup> ± 2,95x10 <sup>8</sup>	7,78x10 <sup>8</sup> ± 4,03x10 <sup>8</sup>	2,00x10 <sup>8</sup> ± 3,40x10 <sup>7</sup>	1,70x10 <sup>4</sup> ± 1,06x10 <sup>4</sup>	4,10x10 <sup>4</sup> ± 3,41x10 <sup>4</sup>	7,21x10 <sup>6</sup> ± 7,61x10 <sup>6</sup>	2,5
<i>E. coli</i> 3920	1,11x10 <sup>9</sup> ± 4,65x10 <sup>8</sup>	1,05x10 <sup>9</sup> ± 3,17x10 <sup>8</sup>	2,68x10 <sup>8</sup> ± 2,25x10 <sup>7</sup>	1,40x10 <sup>4</sup> ± 5,16x10 <sup>3</sup>	1,50x10 <sup>5</sup> ± 3,16x10 <sup>4</sup>	2,84x10 <sup>5</sup> ± 2,17x10 <sup>4</sup>	2,5
<i>E. coli</i> 3663	8,42x10 <sup>8</sup> ± 4,72x10 <sup>8</sup>	2,08x10 <sup>8</sup> ± 9,07x10 <sup>7</sup>	9,26x10 <sup>8</sup> ± 8,09x10 <sup>8</sup>	7,51x10 <sup>6</sup> ± 6,48x10 <sup>6</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	2,5
<i>E. coli</i> J62 -2	1,83x10 <sup>9</sup> ± 1,57x10 <sup>8</sup>	1,36x10 <sup>9</sup> ± 3,20x10 <sup>8</sup>	5,70x10 <sup>8</sup> ± 2,31x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	5,6
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	1,87x10 <sup>9</sup> ± 4,57x10 <sup>8</sup>	1,17x10 <sup>9</sup> ± 7,34x10 <sup>8</sup>	1,67x10 <sup>8</sup> ± 7,48x10 <sup>7</sup>	1,37x10 <sup>5</sup> ± 1,42x10 <sup>5</sup>	3,58x10 <sup>6</sup> ± 2,72x10 <sup>6</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	5,6
<i>P. aeruginosa</i> MPAO1	2,85x10 <sup>9</sup> ± 1,25x10 <sup>9</sup>	1,19x10 <sup>9</sup> ± 6,05x10 <sup>8</sup>	1,81x10 <sup>9</sup> ± 1,17x10 <sup>9</sup>	1,07x10 <sup>4</sup> ± 1,34x10 <sup>3</sup>	4,50x10 <sup>4</sup> ± 4,38x10 <sup>4</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	5,6
<i>P. aeruginosa</i> N242	3,73x10 <sup>9</sup> ± 7,78x10 <sup>8</sup>	3,63x10 <sup>9</sup> ± 2,82x10 <sup>9</sup>	2,55x10 <sup>9</sup> ± 1,47x10 <sup>9</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	6,60x10 <sup>4</sup> ± 6,24x10 <sup>4</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	5,6
<i>P. aeruginosa</i> U387c	2,27x10 <sup>9</sup> ± 7,67x10 <sup>8</sup>	1,54x10 <sup>9</sup> ± 5,15x10 <sup>8</sup>	2,84x10 <sup>9</sup> ± 2,88x10 <sup>9</sup>	1,38x10 <sup>5</sup> ± 4,24x10 <sup>4</sup>	1,76x10 <sup>6</sup> ± 1,74x10 <sup>6</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	5,6
<i>E. coli</i> J62 -2	2,56x10 <sup>8</sup> ± 3,78x10 <sup>7</sup>	1,04x10 <sup>9</sup> ± 2,12x10 <sup>8</sup>	5,70x10 <sup>8</sup> ± 2,31x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	15
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,08x10 <sup>8</sup> ± 1,69x10 <sup>7</sup>	1,11x10 <sup>8</sup> ± 1,52x10 <sup>7</sup>	1,31x10 <sup>8</sup> ± 2,23x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	15
<i>K. pneumoniae</i> KP15	1,67x10 <sup>9</sup> ± 7,45x10 <sup>8</sup>	8,20x10 <sup>8</sup> ± 5,41x10 <sup>8</sup>	2,04x10 <sup>8</sup> ± 3,20x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	2,40x10 <sup>4</sup> ± 1,65x10 <sup>4</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	15
<i>K. pneumoniae</i> KP20	2,44x10 <sup>8</sup> ± 6,48x10 <sup>7</sup>	1,59x10 <sup>9</sup> ± 2,85x10 <sup>8</sup>	1,46x10 <sup>8</sup> ± 8,29x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	15
<i>K. pneumoniae</i> KP11	7,19x10 <sup>8</sup> ± 5,14x10 <sup>8</sup>	7,19x10 <sup>8</sup> ± 5,14x10 <sup>8</sup>	1,00x10 <sup>8</sup> ± 5,74x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	< 1,00x10 <sup>4</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	15

UFC: Unidades formadoras de colonias. Se reporta la media ± desviación estándar. DS: Desviación estándar.

Luego, para corroborar si las diferencias observadas entre los títulos de los cultivos en presencia y ausencia de CdCl<sub>2</sub> fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), se realizó un ANOVA multifactorial. Los resultados del análisis se muestran en la tabla VIII.

Los valores de probabilidad fueron inferiores a 0,05 para todos los factores y sus interacciones. Indicando que hubo diferencias significativas entre los títulos, para al menos uno de los aislados. Al realizar la prueba a posteriori LSD de Fisher, se corroboró que todos los títulos en presencia de CdCl<sub>2</sub> fueron diferentes de los títulos en ausencia de CdCl<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ )

La prueba también permitió determinar que el factor más influyente en los resultados para las tres especies de estudio fue el CdCl<sub>2</sub>. Lo cual se ve reflejado en el valor F obtenido. El cual fue mucho más alto para el CdCl<sub>2</sub> que para el resto de los factores y sus interacciones.

**Tabla VIII:** Efecto de los factores cepa, temperatura, concentración de CdCl<sub>2</sub>, y sus interacciones, sobre la viabilidad de los aislados bacterianos.

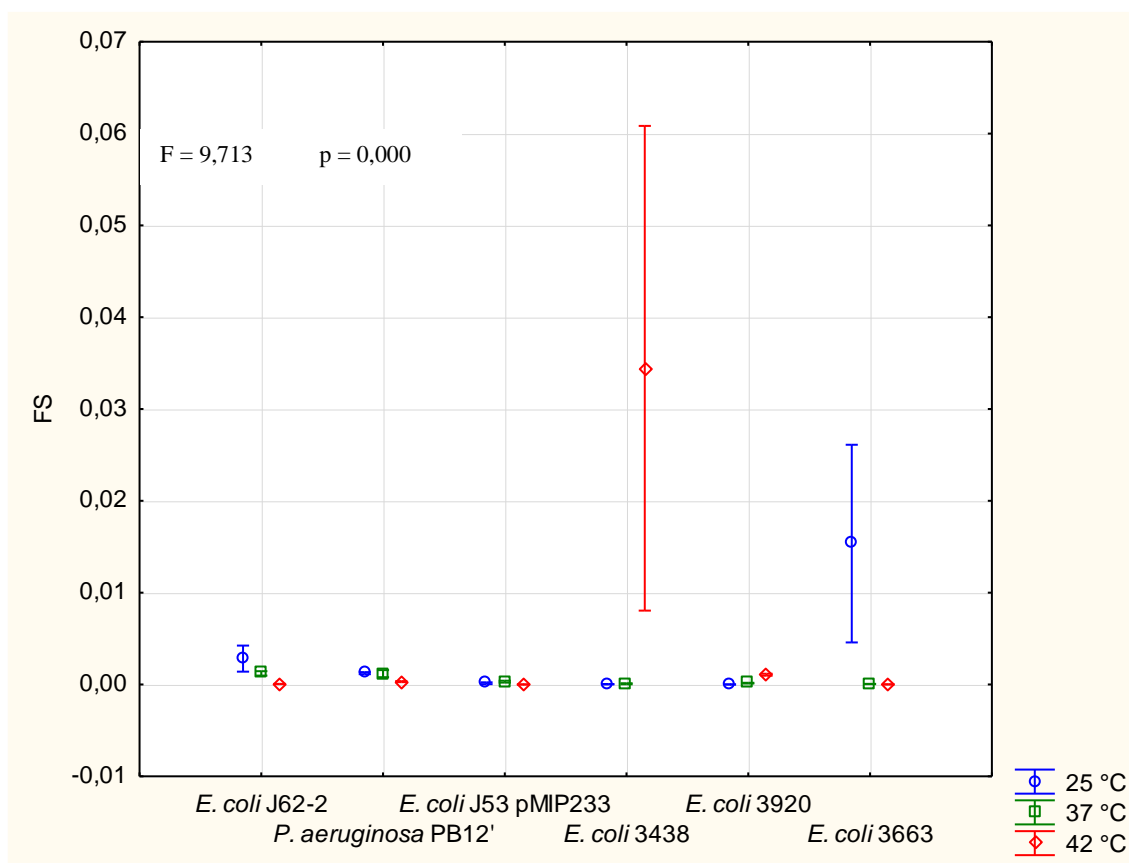
Factor	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	F	p	F	p	F	p
Cepa	13.434	0.000	12.745	0.000	5.828	0.0036
Temperatura (°C)	7.027	0.001	4.482	0.012	37.859	0.0000
[CdCl <sub>2</sub> ]	455.377	0.000	274.050	0.000	271.257	0.0000
Cepa * Temperatura (°C)	9.052	0.000	2.328	0.034	20.166	0.0000
Cepa * [CdCl <sub>2</sub> ]	13.457	0.000	12.770	0.000	5.828	0.0036
Temperatura (°C) * [CdCl <sub>2</sub> ]	6.989	0.001	4.495	0.012	37.858	0.0000
Cepa*Temperatura (°C) * [CdCl <sub>2</sub> ]	9.105	0.000	2.326	0.034	20.166	0.0000

Se reportan los valores de p, y del estadístico F de Fisher, con un n = 10.

### 6.1.2.1 Ensayos de viabilidad para aislados de *E. coli*

Se realizaron ensayos de viabilidad en CN para los aislados de *E. coli* en presencia y ausencia de 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub>. Los resultados se presentan con la FS (Figura 10).

Los aislados de *E. coli* tuvieron una FS menor a 0,01, a excepción de *E. coli* 3438 a 42 °C y *E. coli* 3663 a 25 °C, tal como se muestra en la figura 10. Por lo tanto, el efecto del CdCl<sub>2</sub> a 2,5 mM, sobre la viabilidad de los aislados de *E. coli* fue bactericida en la mayoría de los casos. Para *E. coli* 3438 a 42 °C y *E. coli* 3663 a 25 °C fue bacteriostático, presentando una media de FS de 0,03 y 0,02 respectivamente.



**Figura 10:** Fracción de supervivencia (FS) de los aislados de *E. coli*, y *P. aeruginosa* PB12', en presencia 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub>, a 25 °C, 37 °C y 42 °C. La FS fue menor a 0,01 en la mayoría de las condiciones evaluadas, indicando que el CdCl<sub>2</sub> tuvo un efecto bactericida. Únicamente *E. coli* 3438 a 42 °C y *E. coli* 3663 a 25 °C presentaron mayor FS. Se reporta la media aritmética ± el intervalo de confianza al 95 %, para la prueba LSD de Fisher, con un n = 10.

Para corroborar si las diferencias observadas en la FS entre los aislados, fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), se realizó un ANOVA multifactorial (Tabla IX).

Los valores de probabilidad fueron inferiores a 0,05 para los factores cepa, temperatura y su interacción. Indicando que hubo diferencias significativas en la FS para al menos uno de los aislados, por lo que se realizó la prueba a posteriori LSD de Fisher. (Figura 10). Además, el valor de F más alto se obtuvo para la interacción entre las variables temperatura y cepa, indicando que el efecto sinérgico entre ambos factores tuvo una mayor influencia sobre la viabilidad, en comparación con los efectos aislados.

La prueba LSD de Fisher indicó que únicamente *E. coli* 3438 a 42 °C y *E. coli* 3663 a 25 °C presentaron una FS estadísticamente distinta al resto de los aislados. Cabe destacar que la dispersión de los datos para estos aislados fue más alta que para los demás (Figura 10).

Asimismo, no hubo diferencias significativas entre las cepas escogidas como controles positivos y negativos, respecto a la mayoría de los aislados (Prueba LSD de Fisher, Figura 10)

**Tabla IX:** Efecto de los factores cepa, temperatura y sus interacciones sobre la FS de los aislados, en los ensayos con 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub>.

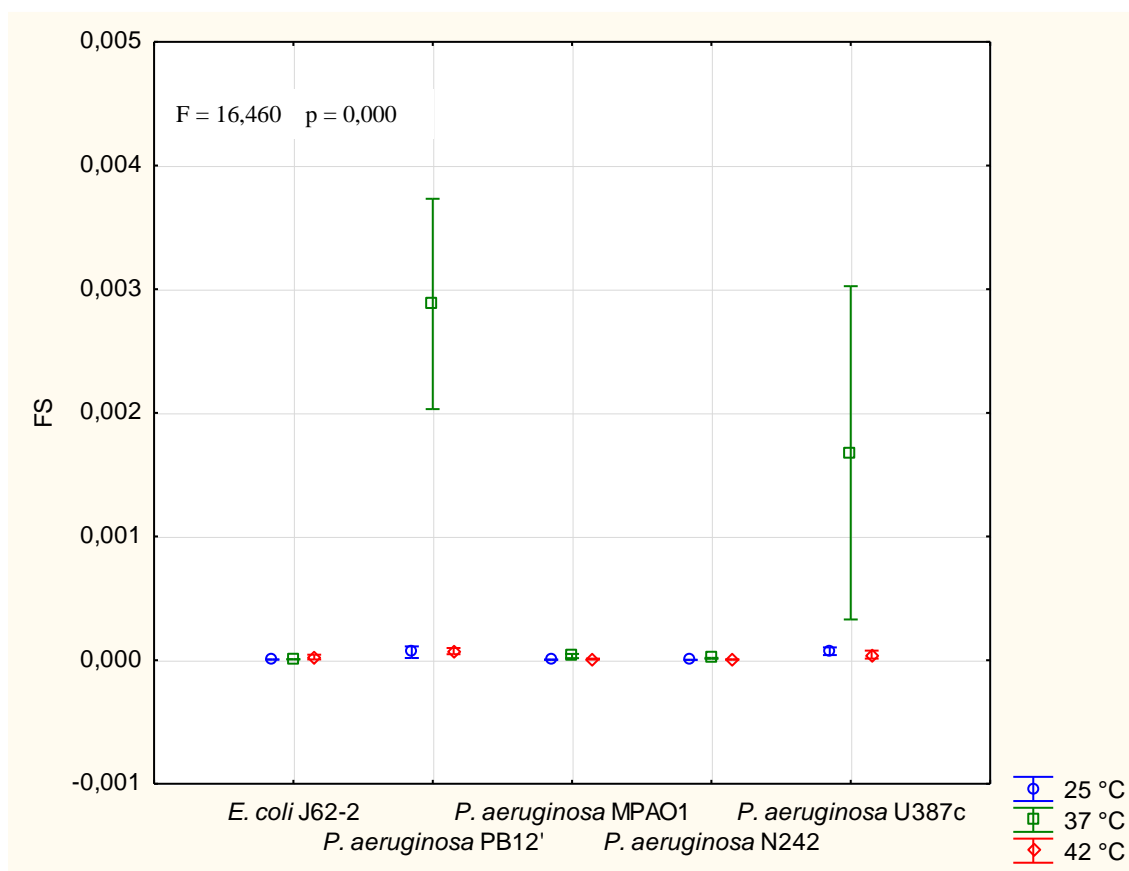
<b>Factor</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cepa	6,6888	0,00001
Temperatura (°C)	5,1025	0,00701
Cepa * Temperatura (°C)	9,7126	0,00000

Se reportan los valores de p, y del estadístico F de Fisher, con un n = 10.

### 6.1.2.2 Ensayos de viabilidad para aislados de *P. aeruginosa*

Se realizaron ensayos de viabilidad de *P. aeruginosa* en CN en presencia y ausencia de 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>. Los resultados se presentan mediante la FS (Figura 11).

La media aritmética de la FS fue inferior a 0,003 para todos los aislados en presencia de 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>, como se observa en la figura 11. Asimismo, la mayoría de los aislados en las condiciones ensayadas redujeron su viabilidad en más del 99,9 %, indicando que el CdCl<sub>2</sub> tuvo un efecto bactericida sobre los mismos. Sin embargo, *P. aeruginosa* PB12' y *P. aeruginosa* U387c presentaron mayor viabilidad a 37 °C.



**Figura 11:** Fracción de supervivencia (FS) de los aislados pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* en presencia de 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>, a 25 °C, 37 °C y 42 °C. La FS fue menor a 0,003 en todas las condiciones evaluadas, indicando que el CdCl<sub>2</sub> tuvo un efecto bactericida. Únicamente PB12' y U387c a 37 °C presentaron mayor FS. Se reporta la media aritmética ± el intervalo de confianza al 95 %, para la prueba LSD de Fisher, con un n = 10.

Para determinar si las diferencias observadas en la FS entre los aislados, fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), se realizó un ANOVA multifactorial. Los resultados del análisis se muestran en la tabla X.

Los valores de probabilidad fueron inferiores a 0,05 para los dos factores y su interacción. Indicando que hubo diferencias significativas en la FS para al menos uno de los aislados. Además, el valor de F más alto fue para la temperatura, revelando que fue el factor con mayor influencia sobre la viabilidad de los aislados de *P. aeruginosa* después del CdCl<sub>2</sub>.

**Tabla X:** Efecto de los factores cepa, temperatura y sus interacciones sobre la FS de los aislados, en los ensayos con 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>.

Factor	F	p
Cepa	18,8320	0,0000
Temperatura (°C)	39,9802	0,0000
Cepa * Temperatura (°C)	16,4599	0,0000

Se reportan los valores de p, y del estadístico F de Fisher, con un n = 10.

La prueba a posteriori LSD de Fisher destacó que únicamente *P. aeruginosa* PB12' y *P. aeruginosa* U387c a 37 °C presentaron una FS estadísticamente distinta y superior al resto de los aislados. Indicando que para estos aislados el CdCl<sub>2</sub> fue bacteriostático a 37 °C (Figura 11).

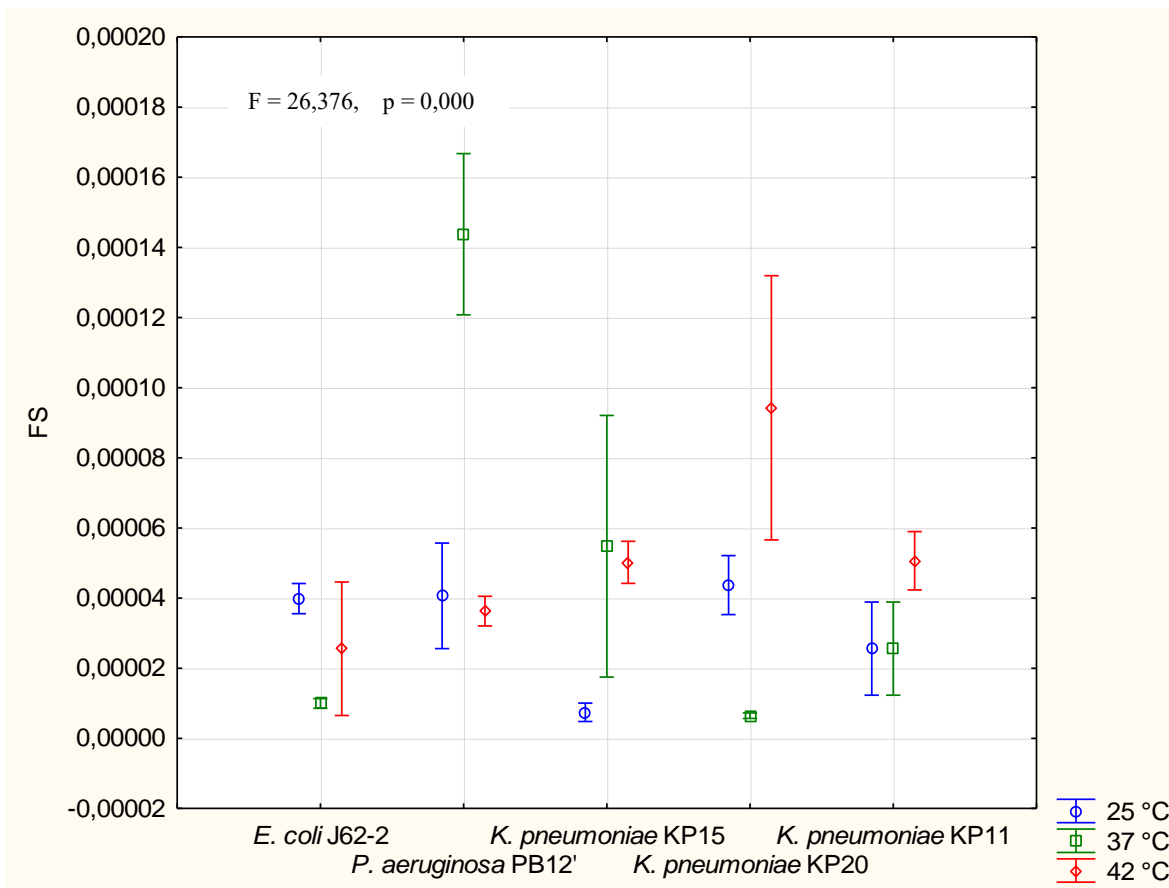
No obstante, la FS de *P. aeruginosa* PB12' en presencia de 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub> (Sección 6.1.2.2), fue similar a la FS en presencia de 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>. Esto pareciera indicar que los resultados observados a 5,6 mM y 37 °C para este aislado, fueron por crecimiento de colonias mutantes. De lo contrario, se hubiese esperado mayor viabilidad a 2,5 mM y no fue de esa manera. Si bien, *P. aeruginosa* PB12' a 37 °C y en presencia de 5,6 mM tuvo una reducción de la viabilidad inferior al 99,9 %, esta estuvo muy cerca de este valor. Se considera entonces la concentración mínima bactericida como menor o igual a 2,5 mM.

### 6.1.2.3 Ensayos de viabilidad para aislados de *K. pneumoniae*

Se realizaron ensayos de viabilidad en CN en presencia y ausencia de 15 mM de CdCl<sub>2</sub>. Los resultados se presentan mediante la FS (Figura 12).

Ninguno de los aislados de *K. pneumoniae* fue capaz de sobrevivir a 15 mM de CdCl<sub>2</sub>. La media aritmética de la FS fue inferior a 0,0002 para todos los aislados, como se observa en la figura 12. El CdCl<sub>2</sub> a 15 mM presentó un efecto bactericida sobre los aislados de *K. pneumoniae*, eliminando el 100 % de la población bacteriana a las tres temperaturas del estudio.

En la prueba LSD de Fisher se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la FS de algunos aislados de *K. pneumoniae* ( $p < 0.05$ ; Figura 12). Sin embargo, estas fueron debidas a las diferencias en los títulos de los cultivos control en ausencia del tratamiento. Como la FS es un cociente entre el título del cultivo en tratamiento, y el título del cultivo en ausencia del tratamiento, cualquier variación en alguno de los títulos afectará la FS.



**Figura 12:** Fracción de supervivencia (FS) de los aislados pertenecientes a la especie *K. pneumoniae* en presencia de 15 mM de CdCl<sub>2</sub>, a 25 °C, 37 °C y 42 °C. La reducción de la viabilidad fue mayor al 100 % (FS < 0,001) Se reporta la media aritmética ± el intervalo de confianza al 95 %, para la prueba LSD de Fisher, con un n = 10.

#### 6.1.2.4 Estimación de la concentración mínima bactericida (MBC) de CdCl<sub>2</sub>

En la tabla XI se reportan los porcentajes de reducción de la viabilidad para todos los aislados de este estudio, en los ensayos con distintas concentraciones CdCl<sub>2</sub> a 25 °C, 37 °C y 42 °C. Se puede observar que la mayoría de los aislados redujeron su viabilidad en más del 99,9 % bajo las distintas temperaturas de incubación ensayadas, por lo que las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> empleadas tuvieron un efecto bactericida. Únicamente cuatro aislados presentaron un porcentaje de reducción de la viabilidad inferior al 99,9 % (se muestran en **negrita**), y estadísticamente distinto al resto de los aislados.

**Tabla XI:** Porcentaje de reducción de la viabilidad y concentración mínima bactericida (MBC) de CdCl<sub>2</sub> para los aislados de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* a 25 °C, 37 °C y 42 °C.

Especie	Aislado	Temperatura (°C)	%Rx ± DS	MBC (mM)
<i>E. coli</i>	J62-2	25	99,70 ± 0,24	≤ 2,5
		37	99,88 ± 0,03	≤ 2,5
		42	99,99 ± 0,00	≤ 2,5
	J53	25	99,99 ± 0,01	≤ 2,5
		37	99,97 ± 0,01	≤ 2,5
		42	100,00 ± 0,00	≤ 2,5
	3438	25	100,00 ± 0,00	≤ 2,5
		37	99,99 ± 0,01	≤ 2,5
		42	<b>96,56 ± 3,69</b>	<b>&gt; 2,5</b>
	3920	25	100,00 ± 0,00	≤ 2,5
		37	99,98 ± 0,01	≤ 2,5
		42	99,89 ± 0,02	≤ 2,5
	3663	25	<b>98,47 ± 1,50</b>	<b>&gt; 2,5</b>
		37	99,99 ± 0,00	≤ 2,5
		42	100,00 ± 0,00	≤ 2,5
<i>P. aeruginosa</i>	MPAO-1	25	100,00 ± 0,00	≤ 2,5
		37	100,00 ± 0,00	≤ 2,5
		42	100,00 ± 0,00	≤ 2,5
	PB12'	25	99,99 ± 0,01	≤ 2,5
		37	<b>99,71 ± 0,12</b>	≤ 2,5
		42	99,99 ± 0,00	≤ 2,5
	N242	25	100,00 ± 0,00	≤ 5,6
		37	100,00 ± 0,00	≤ 5,6
		42	100,00 ± 0,00	≤ 5,6
U387c	25	99,99 ± 0,00	≤ 5,6	
	37	<b>99,83 ± 0,19</b>	<b>&gt; 5,6</b>	
	42	100,00 ± 0,00	≤ 5,6	
<i>K. pneumoniae</i>	KP15	25	100,00 ± 0,00	<15
		37	100,00 ± 0,00	<15
		42	100,00 ± 0,00	<15
	KP20	25	100,00 ± 0,00	<15
		37	100,00 ± 0,00	<15
		42	100,00 ± 0,00	<15
	KP11	25	100,00 ± 0,00	<15
		37	100,00 ± 0,00	<15
		42	100,00 ± 0,00	<15

% Rx: % de reducción de la viabilidad. DS: desviación estándar. MBC: Concentración mínima bactericida.

### 6.1.3 Ensayos de viabilidad en presencia de ZnCl<sub>2</sub>

#### 6.1.3.1 Efecto de la concentración de ZnCl<sub>2</sub> sobre la viabilidad bacteriana

Para evaluar el efecto del ZnCl<sub>2</sub> sobre la viabilidad de los aislados bacterianos, se realizaron ensayos en medio líquido en presencia y ausencia de distintas concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> a 37 °C durante 48 h, y se determinó el título sembrando en placas de AN. Las concentraciones utilizadas para cada cepa se disminuyeron en cada ensayo hasta observar colonias en las placas de AN.

Todas las cepas redujeron su viabilidad en presencia de todas las concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> ensayadas. Además, esta reducción fue mayor a concentraciones más altas, indicando que el nivel de toxicidad es dependiente de la concentración (Tabla XII).

Luego, se realizó un ANOVA de una vía para determinar si las diferencias entre los títulos de los cultivos en presencia y ausencia de ZnCl<sub>2</sub> fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Todos los títulos bacterianos en presencia de ZnCl<sub>2</sub> fueron distintos de los títulos de los cultivos control.

Los resultados se muestran en la tabla XII.

**Tabla XII:** Título bacteriano y porcentaje de reducción de la viabilidad para cada aislado a 37 °C, en presencia de distintas concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>.

Aislado	UFC.mL <sup>-1</sup> Control en ausencia de ZnCl <sub>2</sub> ± DS	UFC.mL <sup>-1</sup> Tratamiento con ZnCl <sub>2</sub> ± DS	[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM) Tratamiento	% Rx ± DS	p
<i>E. coli</i> J62-2	2,60x10 <sup>8</sup> ± 2,40x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	3,0	100,00 ± 0,00	0,000
	1,08x10 <sup>8</sup> ± 2,44x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	2,0	100,00 ± 0,00	0,000
	5,61x10 <sup>8</sup> ± 4,26x10 <sup>8</sup>	1,38x10 <sup>4</sup> ± 5,51x10 <sup>3</sup>	1,5	100,00 ± 0,00	0,001
	3,30x10 <sup>7</sup> ± 1,77x10 <sup>7</sup>	1,75x10 <sup>8</sup> ± 1,37x10 <sup>8</sup>	1,0	99,94 ± 0,02	0,000
	1,75x10 <sup>8</sup> ± 1,37x10 <sup>8</sup>	2,40x10 <sup>6</sup> ± 2,75x10 <sup>5</sup>	0,5	97,07 ± 2,36	0,001

Aislado	UFC.mL <sup>-1</sup> Control en ausencia de ZnCl <sub>2</sub> ± DS	UFC.mL <sup>-1</sup> Tratamiento con ZnCl <sub>2</sub> ± DS	[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM) Tratamiento	% Rx ± DS	p
<i>E. coli</i> 3663	3,42x10 <sup>8</sup> ± 4,54x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	3,0	100,00 ± 0,00	0,000
	8,60x10 <sup>8</sup> ± 4,40x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	2,0	100,00 ± 0,00	0,000
	5,11x10 <sup>8</sup> ± 2,63x10 <sup>8</sup>	1,04x10 <sup>4</sup> ± 1,78x10 <sup>3</sup>	1,5	100,00 ± 0,00	0,000
	4,78x10 <sup>8</sup> ± 2,40x10 <sup>8</sup>	7,84x10 <sup>4</sup> ± 6,16x10 <sup>4</sup>	1,0	99,99 ± 0,01	0,000
<i>E. coli</i> 3438	1,40x10 <sup>7</sup> ± 5,16x10 <sup>6</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	3,0	100,00 ± 0,00	0,000
	2,06x10 <sup>8</sup> ± 2,55x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>2</sup>	2,0	100,00 ± 0,00	0,000
	8,80x10 <sup>8</sup> ± 9,19x10 <sup>7</sup>	9,50x10 <sup>4</sup> ± 9,14x10 <sup>4</sup>	1,5	99,99 ± 0,01	0,000
<i>E. coli</i> J53	8,80x10 <sup>7</sup> ± 3,49x10 <sup>7</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	3,0	100,00 ± 0,00	0,000
	7,10x10 <sup>7</sup> ± 4,01x10 <sup>7</sup>	4,00x10 <sup>4</sup> ± 2,21x10 <sup>4</sup>	2,0	99,94 ± 0,01	0,000
	1,63x10 <sup>8</sup> ± 5,68x10 <sup>7</sup>	9,70x10 <sup>5</sup> ± 5,17x10 <sup>5</sup>	1,5	99,44 ± 0,13	0,000
<i>E. coli</i> 3920	1,08x10 <sup>9</sup> ± 1,81x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	3,0	100,00 ± 0,00	0,000
	7,00x10 <sup>8</sup> ± 1,49x10 <sup>8</sup>	5,41x10 <sup>4</sup> ± 5,25x10 <sup>4</sup>	2,0	99,99 ± 0,01	0,000
<i>P. aeruginosa</i> MPAO-1	1,48x10 <sup>9</sup> ± 4,02x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	17,0	100,00 ± 0,00	0,000
	1,44x10 <sup>9</sup> ± 2,07x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	15,0	100,00 ± 0,00	0,000
	2,62x10 <sup>9</sup> ± 1,40x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	14,5	100,00 ± 0,00	0,000
	6,21x10 <sup>9</sup> ± 6,44x10 <sup>9</sup>	6,31x10 <sup>4</sup> ± 6,83x10 <sup>4</sup>	14,0	99,99 ± 0,02	0,007
	3,40x10 <sup>8</sup> ± 3,00x10 <sup>8</sup>	6,39x10 <sup>4</sup> ± 6,74x10 <sup>4</sup>	13,5	99,99 ± 0,01	0,002
	3,18x10 <sup>9</sup> ± 7,81x10 <sup>7</sup>	8,40x10 <sup>8</sup> ± 8,43x10 <sup>7</sup>	3,0	72,32 ± 6,59	0,000
	4,80x10 <sup>8</sup> ± 2,15x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	20,0	100,00 ± 0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i> N242	2,24x10 <sup>9</sup> ± 1,86x10 <sup>9</sup>	1,20x10 <sup>4</sup> ± 4,22x10 <sup>3</sup>	17,0	100,00 ± 0,00	0,001
	1,43x10 <sup>9</sup> ± 5,12x10 <sup>8</sup>	2,29x10 <sup>4</sup> ± 1,47x10 <sup>4</sup>	14,0	100,00 ± 0,00	0,000
	3,14x10 <sup>9</sup> ± 2,17x10 <sup>8</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	12,0	100,00 ± 0,00	0,000
	1,30x10 <sup>9</sup> ± 1,06x10 <sup>9</sup>	< 1,00x10 <sup>2</sup> ± 0,00x10 <sup>1</sup>	10,0	100,00 ± 0,00	0,001

Aislado	UFC.mL <sup>-1</sup> Control en ausencia de ZnCl <sub>2</sub> ± DS	UFC.mL <sup>-1</sup> Tratamiento con ZnCl <sub>2</sub> ± DS	[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM) Tratamiento	% Rx ± DS	p																																																																																																																																																			
<i>P. aeruginosa</i> N242	1,19x10 <sup>9</sup> ±	1,50x10 <sup>7</sup> ±	7,0	99,34 ±	0,007																																																																																																																																																			
	1,22x10 <sup>9</sup>	1,58x10 <sup>7</sup>				<i>P. aeruginosa</i> U387c	1,20x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000	3,53x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,79x10 <sup>9</sup> ±	2,20x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,003	2,59x10 <sup>9</sup>	1,55x10 <sup>2</sup>	6,86x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,001	5,14x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	3,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,005	2,96x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	7,35x10 <sup>8</sup> ±	9,05x10 <sup>3</sup> ±	16,5	100,00 ±	0,000	4,96x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>	<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,50x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000	4,37x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,000	2,26x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5
<i>P. aeruginosa</i> U387c	1,20x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000																																																																																																																																																			
	3,53x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					2,79x10 <sup>9</sup> ±	2,20x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,003	2,59x10 <sup>9</sup>	1,55x10 <sup>2</sup>	6,86x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,001	5,14x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	3,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,005	2,96x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	7,35x10 <sup>8</sup> ±	9,05x10 <sup>3</sup> ±	16,5	100,00 ±	0,000	4,96x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>	<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,50x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000	4,37x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,000	2,26x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000		1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±		0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>
	2,79x10 <sup>9</sup> ±	2,20x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,003																																																																																																																																																			
	2,59x10 <sup>9</sup>	1,55x10 <sup>2</sup>					6,86x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,001	5,14x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	3,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,005	2,96x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	7,35x10 <sup>8</sup> ±	9,05x10 <sup>3</sup> ±	16,5	100,00 ±	0,000	4,96x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>	<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,50x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000	4,37x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,000		2,26x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000		1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0		98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±		0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±		< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>				
	6,86x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,001																																																																																																																																																			
	5,14x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					3,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,005	2,96x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	7,35x10 <sup>8</sup> ±	9,05x10 <sup>3</sup> ±	16,5	100,00 ±	0,000	4,96x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>	<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,50x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000	4,37x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,000		2,26x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±		0,000	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±		6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000		6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±		3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>										
	3,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,005																																																																																																																																																			
	2,96x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>				7,35x10 <sup>8</sup> ±	9,05x10 <sup>3</sup> ±	16,5	100,00 ±	0,000	4,96x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>	<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,50x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000	4,37x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,000	2,26x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>		4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±		0,000	7,89x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±		5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±		0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																	
7,35x10 <sup>8</sup> ±	9,05x10 <sup>3</sup> ±	16,5	100,00 ±	0,000																																																																																																																																																				
4,96x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>				<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,50x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±	0,000	4,37x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,000	2,26x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>		6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±		0,000	1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±		5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000		3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																								
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	2,50x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	20,0	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	4,37x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±	0,000	2,26x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>		4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000		1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0		100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000		3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																															
	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	18,0	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	2,26x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±	0,002	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>		4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000		2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																							
	4,92x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,5	100,00 ±		0,002																																																																																																																																																		
	4,29x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>			2,13x10 <sup>8</sup> ±		2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000	5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>		6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>		8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																															
2,13x10 <sup>8</sup> ±	2,30x10 <sup>4</sup> ±	17,0	99,99 ±	0,000																																																																																																																																																				
5,23x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>				<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>		6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>		8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																							
<i>K. pneumoniae</i> KP15	4,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	1,49x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±	0,000	1,21x10 <sup>8</sup>		4,57x10 <sup>6</sup>	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000		2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																														
	2,59x10 <sup>8</sup> ±	4,20x10 <sup>6</sup> ±	7,0	98,87 ±		0,000																																																																																																																																																		
	1,21x10 <sup>8</sup>	4,57x10 <sup>6</sup>					6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±	0,000	7,89x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>		8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																						
	6,20x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	6,0	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	7,89x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±	0,000	1,39x10 <sup>8</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>		8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																														
	5,01x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	5,5	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	1,39x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±	0,000	2,47x10 <sup>8</sup>		8,07x10 <sup>2</sup>	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																						
	4,60x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	5,0	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	2,47x10 <sup>8</sup>	8,07x10 <sup>2</sup>					9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±	0,000	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																														
	9,30x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	4,5	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	4,19x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>			8,80x10 <sup>8</sup> ±		1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000	1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>	4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																																						
8,80x10 <sup>8</sup> ±	1,16x10 <sup>3</sup> ±	4,0	100,00 ±	0,000																																																																																																																																																				
1,23x10 <sup>8</sup>	3,03x10 <sup>2</sup>				4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000	2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>		6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																																														
4,27x10 <sup>8</sup> ±	1,27x10 <sup>7</sup> ±	3,0	98,05 ±	0,000																																																																																																																																																				
2,56x10 <sup>8</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>				<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,000	6,67x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000	3,17x10 <sup>7</sup>		0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																																																					
<i>K. pneumoniae</i> KP20	6,00x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	6,67x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,000		3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																																																												
	2,34x10 <sup>8</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	3,0	100,00 ±		0,000																																																																																																																																																		
	3,17x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>					6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000	1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																																																																				
	6,70x10 <sup>8</sup> ±	1,20x10 <sup>2</sup> ±	2,0	100,00 ±	0,000																																																																																																																																																			
1,83x10 <sup>8</sup>	4,22x10 <sup>1</sup>	2,36x10 <sup>9</sup> ±				2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002	2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																																																																													
2,36x10 <sup>9</sup> ±	2,45x10 <sup>5</sup> ±	1,5	99,99 ±	0,002																																																																																																																																																				
2,08x10 <sup>9</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>																																																																																																																																																							

Aislado	UFC.mL <sup>-1</sup> Control en ausencia de ZnCl <sub>2</sub> ± DS	UFC.mL <sup>-1</sup> Tratamiento con ZnCl <sub>2</sub> ± DS	[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM) Tratamiento	% Rx ± DS	p
<i>K. pneumoniae</i> KP11	1,06x10 <sup>9</sup> ±	< 1,00x10 <sup>2</sup> ±	17,0	100,00 ±	0,00
	1,07x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>			
	2,46x10 <sup>8</sup> ±	6,30x10 <sup>2</sup> ±	3,5	100,00 ±	0,00
	1,21x10 <sup>8</sup>	5,93x10 <sup>2</sup>			
	1,51x10 <sup>9</sup> ±	1,20x10 <sup>4</sup> ±	3,0	100,00 ±	0,002
	1,31x10 <sup>9</sup>	4,22x10 <sup>3</sup>			

Se reporta la media ± desviación estándar y la p del ANOVA de una vía para determinar diferencias entre los títulos del tratamiento y los títulos del control. UFC: Unidades formadoras de colonias. DS: Desviación estándar. % Rx: % de reducción de la viabilidad.

### 6.1.3.2 Ensayos de viabilidad en función de la temperatura de incubación y ZnCl<sub>2</sub>

Una vez obtenida una concentración de ZnCl<sub>2</sub> tal que no inhibiese por completo el crecimiento de colonias en las placas de AN, se realizaron ensayos de viabilidad a 25 °C, 37 °C y 42 °C para evaluar el efecto de la temperatura en presencia y ausencia de dichas concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>. Luego de las 48 h de incubación en CN, se realizó la titulación de los cultivos del tratamiento en placas de AN y placas de AN suplementadas con ZnCl<sub>2</sub> a la misma concentración utilizada en el medio líquido.

Todas las cepas tuvieron títulos bacterianos más bajos en presencia de ZnCl<sub>2</sub>. Sin embargo, para algunos aislados la supervivencia fue mayor a 25 °C y 42 °C, que a 37 °C.

Para evaluar si las diferencias observadas entre los cultivos en presencia y ausencia de ZnCl<sub>2</sub> fueron significativas, se realizó la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney. Obteniendo que, para las tres temperaturas del estudio, todos los títulos de los cultivos en presencia de ZnCl<sub>2</sub>, presentaron diferencias significativas (p < 0,05) respecto a los títulos de los cultivos control en ausencia de ZnCl<sub>2</sub> (Tabla XIII).

En los resultados obtenidos en AN suplementado con ZnCl<sub>2</sub>, el título fue menor a 1,00x10<sup>2</sup> ± 0,00x10<sup>1</sup> en todos los casos (reducción de la viabilidad superior al 99,9 %). Por lo que no se reportan los datos.

**Tabla XIII:** Título bacteriano para cada aislado a las 48 h de incubación a 25 °C, 37 °C y 48 °C, creciendo en ausencia y en presencia de ZnCl<sub>2</sub>.

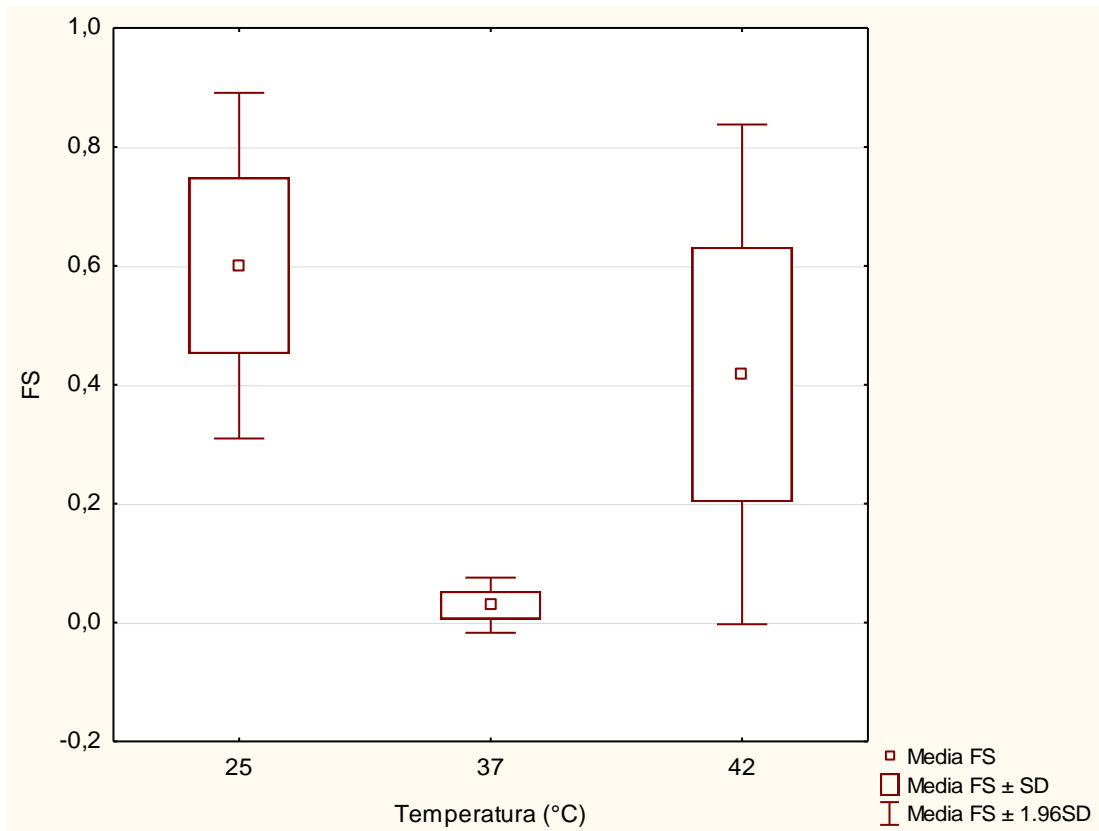
Aislado	UFC.mL <sup>-1</sup>			UFC.mL <sup>-1</sup>			[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM)	p		
	Control en ausencia de ZnCl <sub>2</sub>			Tratamiento con ZnCl <sub>2</sub>				25	37	42
	Temperatura (°C) ± DS			Temperatura (°C) ± DS						
	25	37	42	25	37	42				
<i>E. coli</i> J62-2	7,10x10 <sup>7</sup>	1,75x10 <sup>8</sup>	3,20x10 <sup>7</sup>	4,42x10 <sup>7</sup>	2,40x10 <sup>6</sup>	9,90x10 <sup>6</sup>	0,5	0,011	0,000	0,004
	±	±	±	±	±	±				
	2,28x10 <sup>7</sup>	1,37x10 <sup>8</sup>	1,99x10 <sup>7</sup>	1,94x10 <sup>7</sup>	2,75x10 <sup>5</sup>	2,88x10 <sup>6</sup>				
<i>E. coli</i> J53	1,03x10 <sup>9</sup>	1,63x10 <sup>9</sup>	2,05x10 <sup>8</sup>	4,20x10 <sup>8</sup>	9,70x10 <sup>5</sup>	1,11x10 <sup>8</sup>	1,5	0,001	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	4,99x10 <sup>8</sup>	5,68x10 <sup>8</sup>	4,88x10 <sup>7</sup>	1,40x10 <sup>8</sup>	5,17x10 <sup>5</sup>	2,33x10 <sup>7</sup>				
<i>E. coli</i> 3438	1,60x10 <sup>9</sup>	8,80x10 <sup>8</sup>	2,16x10 <sup>8</sup>	3,82x10 <sup>8</sup>	9,50x10 <sup>4</sup>	5,60x10 <sup>7</sup>	1,5	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	5,03x10 <sup>8</sup>	9,19x10 <sup>7</sup>	1,20x10 <sup>8</sup>	4,38x10 <sup>8</sup>	9,14x10 <sup>4</sup>	2,41x10 <sup>7</sup>				
<i>E. coli</i> 3920	1,22x10 <sup>9</sup>	7,00x10 <sup>8</sup>	2,30x10 <sup>8</sup>	1,15x10 <sup>5</sup>	5,41x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	2,0	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	4,61x10 <sup>8</sup>	1,49x10 <sup>8</sup>	8,45x10 <sup>7</sup>	1,24x10 <sup>5</sup>	5,25x10 <sup>4</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>				
<i>E. coli</i> 3663	7,00x10 <sup>8</sup>	5,11x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>9</sup>	3,40x10 <sup>8</sup>	1,04x10 <sup>4</sup>	1,42x10 <sup>8</sup>	1,0	0,033	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	4,08x10 <sup>8</sup>	2,63x10 <sup>8</sup>	3,68x10 <sup>8</sup>	2,22x10 <sup>8</sup>	1,78x10 <sup>3</sup>	9,94x10 <sup>7</sup>				
<i>P. aeruginosa</i> MPAO -1	9,95x10 <sup>9</sup>	3,40x10 <sup>8</sup>	4,40x10 <sup>8</sup>	2,62x10 <sup>4</sup>	6,79x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	13,5	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	1,02x10 <sup>10</sup>	3,00x10 <sup>8</sup>	3,83x10 <sup>8</sup>	2,88x10 <sup>4</sup>	7,09x10 <sup>4</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>				
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	1,19x10 <sup>10</sup>	2,13x10 <sup>8</sup>	7,58x10 <sup>8</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	2,30x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	17,0	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	1,22x10 <sup>10</sup>	5,23x10 <sup>7</sup>	7,06x10 <sup>8</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>	1,77x10 <sup>4</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>				
<i>P. aeruginosa</i> N242	3,57x10 <sup>9</sup>	3,57x10 <sup>8</sup>	7,60x10 <sup>8</sup>	9,00x10 <sup>7</sup>	1,50x10 <sup>7</sup>	8,40x10 <sup>6</sup>	7,0	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	1,48x10 <sup>9</sup>	1,34x10 <sup>8</sup>	1,43x10 <sup>8</sup>	1,10x10 <sup>8</sup>	1,58x10 <sup>7</sup>	2,17x10 <sup>6</sup>				
<i>P. aeruginosa</i> U387c	8,37x10 <sup>9</sup>	7,35x10 <sup>8</sup>	2,71x10 <sup>8</sup>	1,40x10 <sup>2</sup>	9,05x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>2</sup>	16,5	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	<				
	6,37x10 <sup>9</sup>	4,96x10 <sup>8</sup>	1,33x10 <sup>8</sup>	6,99x10 <sup>1</sup>	±1,10x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>1</sup>				
<i>K. pneumoniae</i> KP15	9,70x10 <sup>8</sup>	4,27x10 <sup>8</sup>	1,41x10 <sup>8</sup>	9,91x10 <sup>6</sup>	1,27x10 <sup>7</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	3,0	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	4,47x10 <sup>8</sup>	2,56x10 <sup>8</sup>	1,20x10 <sup>7</sup>	1,05x10 <sup>7</sup>	1,34x10 <sup>7</sup>	0,00x10 <sup>1</sup>				
<i>K. pneumoniae</i> KP20	2,44x10 <sup>8</sup>	2,36x10 <sup>9</sup>	1,19x10 <sup>9</sup>	7,80x10 <sup>8</sup>	2,45x10 <sup>5</sup>	7,70x10 <sup>7</sup>	1,5	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	6,48x10 <sup>7</sup>	2,08x10 <sup>9</sup>	3,54x10 <sup>8</sup>	2,25x10 <sup>8</sup>	2,67x10 <sup>5</sup>	2,26x10 <sup>7</sup>				
<i>K. pneumoniae</i> KP11	7,10x10 <sup>8</sup>	1,51x10 <sup>8</sup>	1,73x10 <sup>8</sup>	3,30x10 <sup>6</sup>	1,20x10 <sup>4</sup>	2,30x10 <sup>4</sup>	3,0	0,000	0,000	0,000
	±	±	±	±	±	±				
	3,07x10 <sup>8</sup>	1,31x10 <sup>8</sup>	7,12x10 <sup>7</sup>	1,49x10 <sup>6</sup>	4,22x10 <sup>3</sup>	8,23x10 <sup>3</sup>				

Se reporta la media ± DS. UFC: Unidades formadoras de colonias. DS: Desviación estándar.

Una vez realizado esto, para comprobar si las diferencias observadas en los títulos bacterianos a 25 °C, 37 °C y 42 °C tenían significancia estadística, se procedió a comparar las FS de cada aislado para las tres temperaturas. Esto se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Figuras 13, 14 y 15).

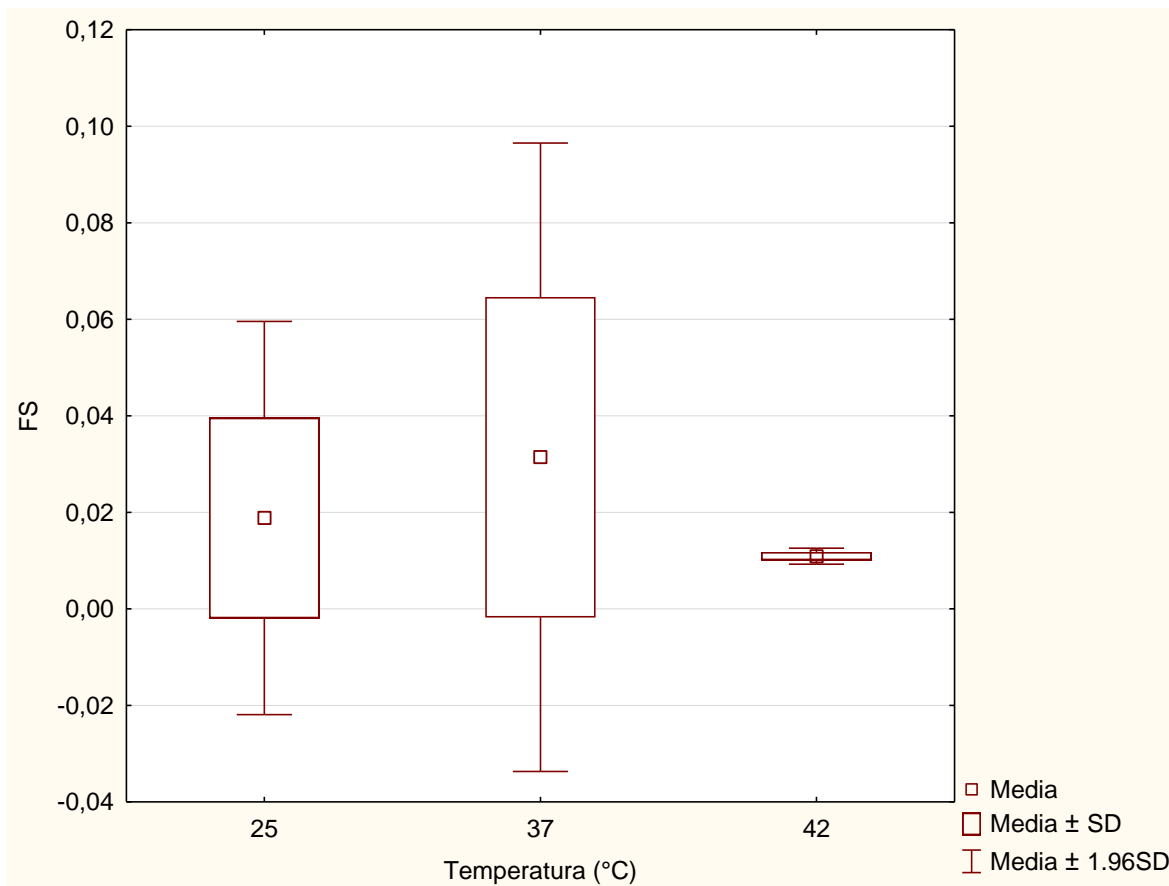
Los resultados muestran que no todos los aislados presentaron diferencias significativas entre las temperaturas del estudio. Sin embargo, para aquellos que sí lo hicieron, la FS fue menor a 37 °C que a 25 °C y a 42 °C. También fue posible clasificar a los aislados en 3 grupos, respecto a las diferencias observadas entre ellos.

El primer grupo, conformado por *E. coli* J62-2, *E. coli* J53 y *E. coli* 3438, presentó una menor viabilidad a 37 °C que a 25 °C y 42 °C, pero no hubo diferencias significativas en la FS a 25 °C y 42 °C. Por lo que, a estas dos temperaturas, pareciera atenuarse el efecto tóxico del ZnCl<sub>2</sub> en las concentraciones utilizadas. En la Figura 13, se muestran gráficos de cajas y bigotes para la FS de *E. coli* J62-2, en función de la temperatura de incubación. Los otros dos aislados presentaron la misma tendencia, por lo que se omite el análisis.



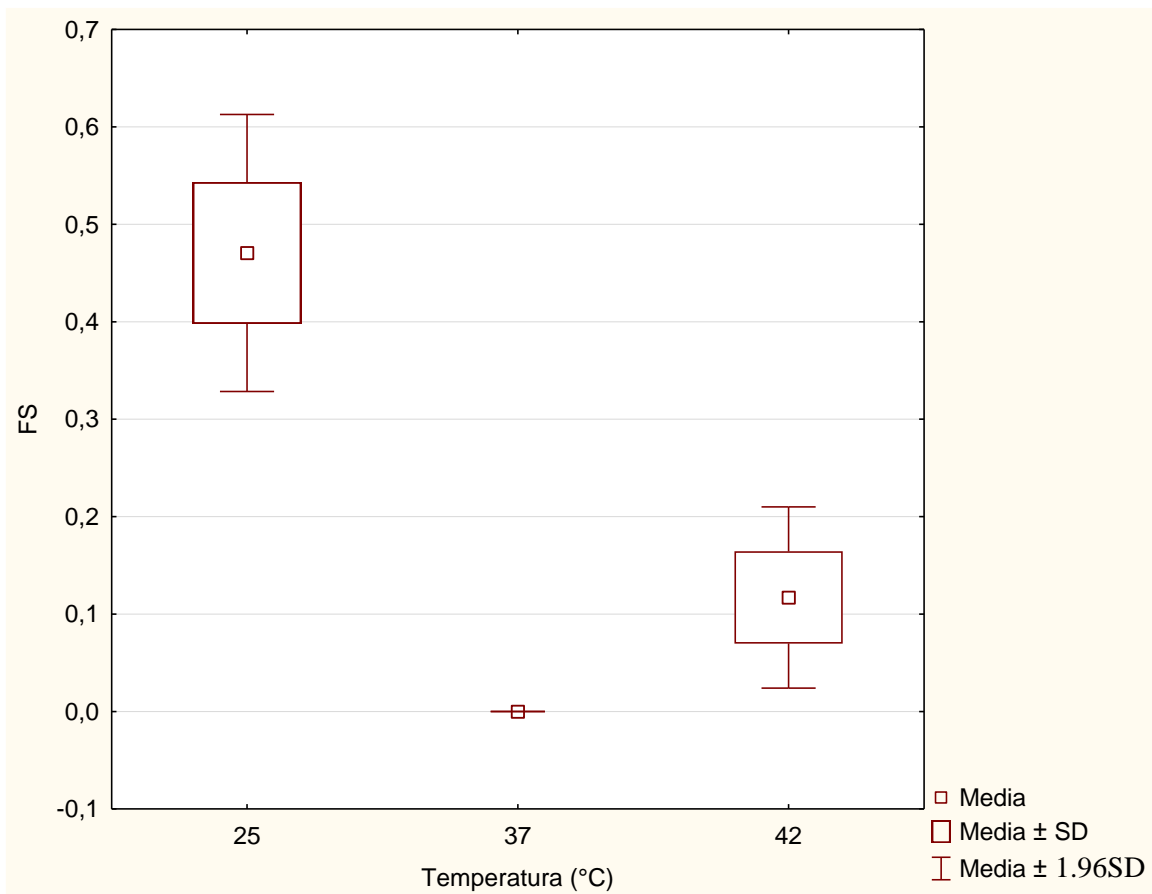
**Figura 13:** Fracción de supervivencia (FS) de *E. coli* J62-2 en presencia de 0,5 mM de  $ZnCl_2$ , a 25 °C, 37 °C y 42 °C. Se observa que la FS fue menor a 37 °C que a 25 °C y 42 C. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las temperaturas de 25 °C y 42 °C. La caja pequeña representa la media aritmética de la FS, la caja grande la media de la FS  $\pm$  la desviación estándar, y los bigotes el intervalo de confianza al 95 %.

Para el segundo grupo, conformado por todos los aislados de *P. aeruginosa*, *E. coli* 3920 y *K. pneumoniae* KP15, la supervivencia de los aislados fue baja, presentando una media de la FS menor a 0,1. Asimismo, la temperatura no ejerció un efecto significativo sobre la viabilidad de los aislados. En la figura 14, se muestran gráficos de cajas y bigotes para la FS de *P. aeruginosa* N242, en función de la temperatura de incubación. Los demás aislados presentaron la misma tendencia, por lo que se omite el análisis.



**Figura 14:** Fracción de supervivencia (FS) de *P. aeruginosa* N242 en presencia de 7 mM de  $ZnCl_2$ , a 25 °C, 37 °C y 42 °C. No hubo diferencias significativas en la FS a las tres temperaturas del estudio, encontrándose la media de la FS por debajo de 0,1 para los tres casos. La caja pequeña representa la media aritmética de la FS, la caja grande la media de la FS  $\pm$  la desviación estándar, y los bigotes el intervalo de confianza al 95 %.

El tercer grupo que incluye a *K. pneumoniae* KP20, *K. pneumoniae* KP11 y *E. coli* 3663, presentó mayor viabilidad a 25 °C, luego a 42 °C, y por último a 37 °C. En la figura 15 se muestran gráficos de cajas y bigotes para la FS de *E. coli* 3663, en función de la temperatura de incubación. Los demás aislados presentaron la misma tendencia, por lo que se omite el análisis.



**Figura 15:** Fracción de supervivencia (FS) de *E. coli* 3663 en presencia de 1,5 mM de  $ZnCl_2$ , a 25 °C, 37 °C y 42 °C. El aislado presentó una mayor viabilidad a 25 °C, luego a 42 °C, y por último a 37 °C, donde no fue capaz de sobrevivir. La caja pequeña representa la media aritmética de la FS, la caja grande la media de la FS  $\pm$  la desviación estándar, y los bigotes el intervalo de confianza al 95 %.

### 6.1.3.3 Estimación de la concentración mínima bactericida (MBC) de ZnCl<sub>2</sub>

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de reducción de la viabilidad para estimar la concentración mínima bactericida (Tabla XIV). Cuando la reducción de la viabilidad es superior al 99,9 %, el efecto es bactericida. De lo contrario, es bacteriostático.

La reducción de la viabilidad (% Rx) fue mayor a 37 °C que a 25 °C y 42 °C, para 6 de 12 aislados: *E. coli* J62-2, *E. coli* J53, *E. coli* 3438, *E. coli* 3663, *K. pneumoniae* KP20 y *K. pneumoniae* KP11. Para *E. coli* J 62-2 el % Rx fue menor a 99,9 % a las tres temperaturas de incubación, por lo que el ZnCl<sub>2</sub> a la concentración utilizada fue bacteriostático. Los cinco aislados restantes tuvieron un % Rx superior al 99,9 % a 37 °C, y el efecto del ZnCl<sub>2</sub> fue bactericida. Mientras que a 25 °C y 42 °C el % Rx fue inferior al 99,9 %, y el efecto del ZnCl<sub>2</sub> bacteriostático. Cabe destacar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el % Rx a 25 °C y 42 °C para *E. coli* J62 - 2, *E. coli* J53, y *E. coli* 3438.

Todos los aislados de *P. aeruginosa*, *E. coli* 3920 y *K. pneumoniae* KP15 tuvieron una reducción de la viabilidad superior al 99,9 % a las tres temperaturas de incubación. Lo que indica que el ZnCl<sub>2</sub> tuvo un efecto bactericida en las concentraciones ensayadas.

En el caso de *P. aeruginosa* N242, el % Rx fue menor al 99,9 %. Sin embargo, la prueba de Kruskal – Wallis determinó que no se observaron diferencias significativas en el % Rx a las tres temperaturas de incubación.

Por último, la concentración de ZnCl<sub>2</sub> ensayada para *K. pneumoniae* KP11 fue bacteriostática a 25 °C y bactericida a 37 °C y 42 °C.

**Tabla XIV:** Porcentaje de reducción de la viabilidad y concentración mínima bactericida (MBC) de ZnCl<sub>2</sub> para los aislados de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* a 25 °C, 37 °C y 42 °C.

Aislado	Temperatura (°C)	[ZnCl <sub>2</sub> ] (mM)	%Rx ± DS	MBC (mM)
<i>E. coli</i> J62 - 2	25	0,5	39,97 ± 14,83	> 0,5
	37		97,07 ± 2,36	0,5 < MBC ≤ 1,5
	42		58,27 ± 21,44	> 0,5
<i>E. coli</i> J53	25	1,5	55,16 ± 12,58	> 1,5
	37		99,94 ± 0,01	≤ 1,5
	42		45,48 ± 5,69	> 1,5
<i>E. coli</i> 3438	25	1,5	81,08 ± 20,07	≥ 1,5
	37		99,99 ± 0,01	≤ 1,5
	42		70,44 ± 9,95	> 1,5
<i>E. coli</i> 3920	25	2,0	99,99 ± 0,01	≤ 2,0
	37		99,99 ± 0,01	≤ 2,0
	42		99,99 ± 0,00	≤ 2,0
<i>E. coli</i> 3663	25	1,5	52,94 ± 7,25	> 1,5
	37		100,00 ± 0,00	≤ 1,5
	42		88,30 ± 4,74	> 1,5
<i>P. aeruginosa</i> MPAO -1	25	13,5	100,00 ± 0,00	≤ 13,5
	37		99,99 ± 0,01	≤ 13,5
	42		99,99 ± 0,01	≤ 13,5
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	25	17,0	100,00 ± 0,00	≤ 17,0
	37		99,99 ± 0,01	≤ 17,0
	42		99,99 ± 0,01	≤ 17,0
<i>P. aeruginosa</i> N242	25	7,0	98,12 ± 2,08	≤ 7,0
	37		96,86 ± 3,32	≤ 7,0
	42		98,91 ± 0,08	≤ 7,0
<i>P. aeruginosa</i> U387c	25	16,5	100,00 ± 0,00	≤ 16,5
	37		100,00 ± 0,00	≤ 16,5
	42		100,00 ± 0,00	≤ 16,5
<i>K. pneumoniae</i> KP15	25	3,0	99,09 ± 1,04	≤ 3,0
	37		98,06 ± 2,05	≤ 3,0
	42		99,99 ± 0,00	≤ 3,0
<i>K. pneumoniae</i> KP20	25	1,5	23,69 ± 39,14	> 1,5
	37		99,99 ± 0,00	≤ 1,5
	42		93,35 ± 1,32	> 1,5
<i>K. pneumoniae</i> KP11	25	3,0	99,54 ± 0,05	> 3,0
	37		100,00 ± 0,00	≤ 3,0
	42		99,99 ± 0,00	≤ 3,0

% Rx: % de reducción de la viabilidad. DS: Desviación estándar. MBC: Concentración mínima bactericida.

## 6.2 Ensayos de viabilidad en medio sólido

Para realizar los ensayos de transferencia de los posibles determinantes de resistencia a Cd y a Zn mediante el proceso de conjugación, fue necesario determinar la viabilidad de los aislados en medio sólido, y encontrar una concentración de Cd y de Zn a la cual las cepas donantes fuesen viables, pero la receptora no. Para esto, se realizaron ensayos de viabilidad en AN, con aquellos aislados que presentaron una FS superior a la cepa receptora a cualquiera de las condiciones estudiadas, y que además tuviesen plásmidos reportados en estudios previos.

### 6.2.1 Ensayos de viabilidad en presencia de CdCl<sub>2</sub>

Se realizaron ensayos de viabilidad a las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> empleadas en los experimentos en medio líquido, incubando a 37 °C por 48 h. Sin embargo, no se observó crecimiento en las placas, por lo que se procedió a disminuir las concentraciones.

Los únicos aislados que tuvieron crecimiento visible en AN suplementado con CdCl<sub>2</sub> fueron los pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* a 0,5 mM y 1 mM (Tabla XV).

**Tabla XV:** Viabilidad bacteriana en AN suplementado con distintas concentraciones de CdCl<sub>2</sub>.

Aislado	AN	AN + 5.6 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + 2.5 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + 2 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + 1 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + 0.5 mM CdCl <sub>2</sub>
<i>E. coli</i> J62 – 2	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> J53	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 3438	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 3920	+	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> MPAO1	+	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	+	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> N242	+	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> KP15	+	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> KP11	+	-	-	-	-	-

AN: Agar nutritivo. +: Crecimiento. -: Ausencia de crecimiento. Se incubaron las placas a 37 °C, por 48 h.

### 6.2.2 Ensayos de viabilidad en presencia de ZnCl<sub>2</sub>

Se realizaron ensayos de viabilidad en AN suplementado con 1 mM y 3 mM de ZnCl<sub>2</sub>, incubando a 37 °C por 48 h.

Los únicos aislados que tuvieron crecimiento visible fueron los pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* (Tabla XVI).

**Tabla XVI:** Viabilidad bacteriana en AN suplementado con distintas concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>.

Aislado	AN	AN + 3 mM ZnCl <sub>2</sub>	AN + 1 mM ZnCl <sub>2</sub>
<i>E. coli</i> J62-2	+	-	-
<i>E. coli</i> J53	+	-	-
<i>E. coli</i> 3438	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i> MPAO-1	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> N242	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> KP15	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> KP11	+	-	-

AN: Agar nutritivo. +: Crecimiento. -: Ausencia de crecimiento. Se incubaron las placas a 37 °C, por 48 h.

### 6.2.3 Estimación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs)

En base a los resultados obtenidos, en la tabla XVII se presentan las MICs de CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> en AN para los aislados de este estudio. Las MICs son aquellas concentraciones donde no se observó crecimiento visible en las placas.

Todos los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* presentaron una MIC menor o igual a 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>, y menor o igual a 1 mM de ZnCl<sub>2</sub>, debido a que no fueron capaces de crecer a estas concentraciones, que fueron las más bajas ensayadas. El control negativo y cepa receptora para los ensayos de conjugación, *E. coli* J62-2 arrojó el mismo resultado. Se puede observar entonces que los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* no son adecuados para ser utilizados como cepas donantes en el proceso de conjugación.

Por otro lado, tal como se observa en la tabla XVII, los aislados de *P. aeruginosa* presentaron MICs superiores a la cepa *E. coli* J62-2, por lo que sí son adecuadas para ser utilizados como cepas donantes en el proceso de conjugación.

**Tabla XVII:** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> en AN para los aislados de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* a 37 °C.

Aislado	MIC CdCl <sub>2</sub> (mM)	MIC ZnCl <sub>2</sub> (mM)
<i>E. coli</i> J62 - 2	≤ 0.5	≤ 1
<i>E. coli</i> J53	≤ 0.5	≤ 1
<i>E. coli</i> 3438	≤ 0.5	≤ 1
<i>E. coli</i> 3663	≤ 0.5	≤ 1
<i>P. aeruginosa</i> MPAO - 1	1 < MIC ≤ 2	> 3
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	1 < MIC ≤ 2	> 3
<i>P. aeruginosa</i> N242	1 < MIC ≤ 2	1 < MIC ≤ 3
<i>K. pneumoniae</i> KP15	≤ 0.5	≤ 1
<i>K. pneumoniae</i> KP11	≤ 0.5	≤ 1

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

### 6.3 Proceso de conjugación bacteriana

Una vez obtenidas las MICs en medio sólido, se realizó el proceso de conjugación bacteriana para los marcadores de resistencia a Cd, Zn y AMP, de tal forma de evaluar la posible transferencia horizontal de los marcadores de resistencia a estos metales. Se utilizó como cepa receptora *E. coli* J62-2, y como cepas donantes *P. aeruginosa* MPAO1, *P. aeruginosa* PB12' y *P. aeruginosa* N242, las cuales presentaron unas MICs de CdCl<sub>2</sub> y de ZnCl<sub>2</sub> superiores a la cepa receptora, así como resistencia a AMP.

Paralelamente, se realizó un experimento como control positivo del proceso de conjugación, empleando la misma cepa receptora, y como cepas donantes *E. coli* 3574 (Angiolillo, 2007) y *K. pneumoniae* KP14 (Chalbaud, 2010). En trabajos previos del LBPB,

se demostró la capacidad de transferencia de los plásmidos de estas cepas por conjugación. Se utilizó ampicilina como marcador de selección.

En la tabla XVIII se muestran los resultados del proceso de conjugación para los aislados señalados. Las cepas empleadas como control positivo transfirieron sus plásmidos a la cepa receptora, utilizando AMP como marcador de selección. Sin embargo, en la tabla XX se observa que la frecuencia de transferencia fue baja. Por cada 100000 células donantes, al menos de 2 a 3 células, fueron capaces de transferir los genes de resistencia a AMP.

Por otro lado, el aislado *P. aeruginosa* PB12' fue capaz de transferir la resistencia a AMP a la cepa receptora, pero no fue capaz de transferir la resistencia a 1 mM de CdCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> o 1 mM de ZnCl<sub>2</sub>. Mientras que los otros dos aislados de esta especie no fueron capaces de transferir ningún marcador de resistencia. Lo que sugiere que los genes que confieren resistencia a CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> en estos aislados son cromosomales, o se encuentran en plásmidos no conjugativos.

**Tabla XVIII:** Resultados del proceso de conjugación bacteriana para los marcadores de resistencia a AMP, CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>.

Aislado	AN	RIF	AMP	AN + 1 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + 0.5 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + 1 mM ZnCl <sub>2</sub>	AN + AMP + 1 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + AMP + 0.5 mM CdCl <sub>2</sub>	AN + AMP + 1 mM ZnCl <sub>2</sub>
<i>E. coli</i> J62-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T - MPAO-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T - PB12'	+	+	+	-	-	-	-	-	-
T - N242	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T- <i>E. coli</i> 3574 (Control positivo – Angiolillo, 2007)	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T - <i>K. pneumoniae</i> KP14 (Control positivo – Chalbaud, 2010)	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA

AN: Agar nutritivo. RIF: Rifampicina. AMP: Ampicilina. T: transconjugante +: Crecimiento. -: Ausencia de crecimiento. NA: No aplica / No se probó esa condición.

En la tabla XIX, se muestran los valores de la frecuencia de conjugación para el aislado *P. aeruginosa* PB12', y aquellos utilizados como control positivo. La frecuencia de conjugación fue baja para todos los aislados. En un orden de magnitud de 10<sup>-5</sup>.

**Tabla XIX:** Frecuencia de conjugación para el marcador de selección AMP.

Aislado	Título cepa donante (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Título cepa transconjugante (UFC.mL <sup>-1</sup> )	FC
T- <i>E. coli</i> PB12' ( <i>P. aeruginosa</i> PB12')	1.18x10 <sup>9</sup>	2.72x10 <sup>4</sup>	2.31x10 <sup>-5</sup>
T- <i>E. coli</i> 3574 (Control positivo – Angiolillo, 2007)]	2.34x10 <sup>9</sup>	2.38x10 <sup>4</sup>	1.02x10 <sup>-5</sup>
T- <i>E. coli</i> KP14 (Control positivo – Chalbaud, 2010)	2.92x10 <sup>9</sup>	5.20x10 <sup>4</sup>	1.78x10 <sup>-5</sup>

AMP: Ampicilina. UFC: Unidades formadoras de colonias. FC: Frecuencia de conjugación.

### 6.3.1 Pruebas de co-transferencia

Durante el proceso de conjugación bacteriana, pueden transferirse en paralelo distintos marcadores de resistencia a antimicrobianos, ya sea por estar co-localizados en un mismo plásmido, o por estar en otros plásmidos que se co-transferen. Aunque no se observó transferencia de la resistencia a Cd o a Zn en la cepa transconjugantes, llamada de aquí en adelante T – *E. coli* PB12', se realizaron pruebas de co-transferencia a otros antibióticos para determinar si los genes que codifican la resistencia a AMP, fueron transferidos en conjunto a otros marcadores. Ya sea codificados en la misma molécula plasmídica o en plásmidos que se co-transferen.

En estudios previos del LBPB se caracterizó el perfil de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* PB12' (Chalbaud, 2010). En la tabla XX se muestran los resultados de las pruebas de co-transferencia realizadas.

La cepa transconjugante T – *E. coli* PB12' (*P. aeruginosa* PB12') no presentó resistencia a ninguno de los marcadores empleados en las pruebas de co-transferencia. Lo que sugiere que la resistencia a AMP no se encuentra codificada en la misma molécula plasmídica que los marcadores estudiados, o en plásmidos que se co-transferen.

**Tabla XX:** Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas transconjugantes.

Aislado	AMK	CTX	STR	TCY	TOB
<i>P. aeruginosa</i> PB12'	S	S	S	S	S

AMK: Amikacina, CTX: Cefotaxime STR: Estreptomycin. TCY: Tetraciclina. TOB: Tobramicina.

## 7. DISCUSIÓN

Las concentraciones ambientales de Cd y Zn se han incrementado a nivel mundial en los últimos años y con esto, la cantidad de investigaciones sobre bacterias ambientales resistentes a estos metales. Dentro de estos estudios, resaltan aquellos que reportan resistencia conjunta a metales pesados y antibióticos, ya sea por co-resistencia o por resistencia cruzada.

El aumento de bacterias resistentes y multirresistentes a antimicrobianos es un problema de salud pública que genera una alta morbilidad. De hecho, algunos estudios estiman que habrá alrededor de 10 millones de muertes relacionadas a infecciones con bacterias resistentes a antibióticos en el 2050 (Nathan y col., 2014).

En este sentido, existe la posibilidad de que la presión selectiva generada por la contaminación ambiental con metales pesados, en conjunto con los mecanismos de transferencia horizontal de información genética, promueva la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos en las comunidades de microorganismos. De esta manera, podría suceder que algunos aislados de bacterias patógenas hayan obtenido la resistencia a antibióticos como consecuencia de este proceso de selección.

El metal/catión Zn es un contaminante frecuente de aguas residuales y de residuos sólidos de hospitales (Altin y col. 2003; Kumar y col., 2004; Binti, 2011; Adama y col., 2016), además se encuentra presente como componente de algunos insumos médicos (USpatent: 7759327B2), en catéteres urinarios (Derici y col., 2012) y en desinfectantes (Block, 2001). Por otro lado, el metal/catión Cd no es un elemento comúnmente asociado al ambiente hospitalario, pero presenta propiedades químicas similares al Zn, y es capaz de entrar al interior celular a través de bombas y canales de Zn y Mg. Asimismo, existen reportes

de resistencia conjunta a Cd y Zn (Bruzual 2002; Perron y col., 2004; Raja y col., 2008; Malik y Asem., 2010; Khan y col., 2015), lo que sugiere una especie de mimetismo molecular con estos cationes. En este sentido, podría esperarse que los aislados clínicos multirresistentes a antibióticos utilizados en esta investigación, pudiesen presentar resistencia a Zn y, además, que un mismo mecanismo confiriese resistencia a Cd y Zn.

Sin embargo, los resultados obtenidos indican que todos los aislados pertenecientes a las especies *E. coli* y *K. pneumoniae* de estudio fueron sensibles a Cd y Zn a las concentraciones ensayadas en medio sólido. Los aislados clínicos estudiados de *P. aeruginosa*, fueron resistentes a ambos metales, con respecto al control negativo *E.coli* J62-2 (Tabla XVII).

Los aislados *E. coli* J62-2 y *E. coli* J53 presentaron MICs inferiores (tabla XVII) a las reportadas por Bruzual (2002) (2,5 mM de CdCl<sub>2</sub>, y 3 mM de ZnCl<sub>2</sub>, en agar LB). Sin embargo, es posible que las diferencias observadas con este autor sean debido a que la composición de los medios de cultivo utilizados fueron distintas, lo cual puede afectar la biodisponibilidad de los metales y, por lo tanto, su toxicidad.

Bruzual en el 2002, también reportó que las MICs de CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> en agar LB sin NaCl, fueron de 1,3 mM en ambos casos. Lo que sugiere que el NaCl podría disminuir la biodisponibilidad de los iones Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> en el medio de cultivo, y disminuir su toxicidad. El medio de cultivo empleado en este trabajo no presenta NaCl en su composición, lo que concuerda con el hecho de que las MICs obtenidas sean más bajas.

Varios autores han señalado que, dentro de las limitaciones de los ensayos en medios de cultivo suplementados con sales de metales pesados, se encuentra el hecho de que la concentración de metal biodisponible en el medio puede variar en función de su composición, ya que pueden tener agentes quelantes de metales, así como sustancias que formen complejos

insolubles con estos, alterando el efecto que deberían ejercer (Chang y col., 1993; Hassen y col., 1998; Bruzual, 2002).

Por otro lado, los valores de MIC de Cd obtenidos para los aislados de *P. aeruginosa*, fueron similares a los obtenidos en el estudio de Deredjian y colaboradores (2011), mientras que los de Zn fueron inferiores. Estos autores reportaron cepas clínicas de *P. aeruginosa* con resistencia a 0,6 mM y 1,25 mM de Cd. Mientras que para Zn fue de 5 mM, 10 mM y 20 mM de Zn;

En este trabajo no se obtuvieron MICs para ZnCl<sub>2</sub> en todos los aislados, sino que, para la mayoría, estas se encontraron por encima de 3 mM (Tabla XVII). Esto quiere decir que, si se realizaran ensayos a mayores concentraciones, las MIC para este metal podrían ser similares a las del estudio de Deredjian y colaboradores (2011).

Deredjian y colaboradores (2011) también obtuvieron que las concentraciones de Zn a las cuales las cepas presentaron resistencia, están por encima que las de Cd, y el rango de concentraciones también fue más amplio. Esto puede ser debido a las diferencias de toxicidad de ambos metales. El Cd al ser un metal no esencial presenta mayor toxicidad que el Zn que es un oligoelemento. Sin embargo, también es posible que la resistencia a Cd sea menor que a Zn por el bajo nivel de exposición que presentan los aislados clínicos a este metal.

Por otra parte, las diferencias obtenidas en la resistencia de los aislados de *P. aeruginosa*, en comparación con los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*, pudieran haber sido consecuencia de la procedencia de los mismos. Los aislados de *E. coli* de este estudio proceden de urocultivos de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU) y los aislados de *K. pneumoniae* provienen de sangre de pacientes con infecciones nosocomiales. Los valores de referencia de Zn en orina se encuentran entre 7,4 µM y 18,5 µM (Mayo Clinic Laboratories, 2019), y la concentración promedio de Zn, en sangre de personas adultas con

una ingesta normal de este metal, es de  $24,02 \pm 7,03 \mu\text{M}$  (Hussain y col., 2014). Ambos rangos se encuentran varios órdenes de magnitud por debajo de las concentraciones utilizadas para estos ensayos. Por lo que portar genes de resistencia a Zn no parece ser una ventaja selectiva para estas cepas.

Dos de los aislados de *P. aeruginosa* fueron obtenidos en el ambiente hospitalario, y pudieron haber estado expuestos a concentraciones más altas de Zn y quizá de Cd, en comparación con los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

El aislado *P. aeruginosa* PB12' resistente a Cd y a Zn, fue obtenido a partir de secreciones traqueales de un paciente con infección respiratoria, y presenta un mayor nivel de multiresistencia en comparación con las cepas del ambiente hospitalario (Chalbaud, 2010). En este sentido, se ha descrito que las secreciones mucosas presentes en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, contienen concentraciones elevadas de Zn y otros metales (Davies y col., 2017). La presión selectiva de estos antimicrobianos podría explicar la resistencia a Cd y Zn.

Asimismo, la especie *P. aeruginosa* presenta características que le confiere resistencia intrínseca a gran variedad de agentes antimicrobianos. Entre ellos están su baja permeabilidad en la membrana externa y la expresión de bombas de eflujo para múltiples drogas (Strateva y Yordanov, 2009). También ha sido reportada como resistente a Cd y a Zn en numerosos estudios con cepas medioambientales. En estos trabajos los mecanismos de resistencia asociados a este fenotipo han sido variables.

Por ejemplo, Wang y colaboradores (1997) determinaron resistencia a 5 mM de Cd en conjunto con precipitación de este metal en forma de CdS, impidiendo su entrada al interior celular. Mientras que, Sinha y Kumar (2009) demostraron resistencia a 8 mM de Cd en conjunto con bioadsorción a la pared celular, al periplasma, y bioacumulación. Luego,

Meesungnoen y colaboradores (2012) reportaron resistencia a Cd y a Zn, por efecto de los EPS segregados, por bioacumulación y, por bioadsorción. En estos tres trabajos el porcentaje de bioadsorción y bioacumulación fue mayor durante la fase de crecimiento estacionaria, por lo que estos procesos parecieran ser afectados por la fase de crecimiento en la cual se encuentre el cultivo.

En el trabajo realizado no se estudiaron los mecanismos de resistencia expresados por los aislados. Sin embargo, se pudo observar que los aislados de *P. aeruginosa* presentaron mucosidad, la cual se sugiere que pudo ser por secreción de EPS. También se observó una coloración amarillo brillante en las colonias de las cepas *P. aeruginosa* MPAO1 y N242 en presencia de 1 mM de Cd y 1 mM de Zn. Se ha relacionado esta coloración con la producción de pyoverdinas (Meesungnoen y col., 2012). Estos pigmentos son sideróforos fluorescentes que pueden actuar como sustancias quelantes de metales en condiciones de estrés, lo que pudiera disminuir la concentración de los metales en solución, y por tanto su toxicidad (Meesungnoen y col., 2012; Kang y col., 2018).

Algunos aislados ambientales de *P. aeruginosa* pueden presentar resistencia a Cd y Zn, mediante bombas de eflujo codificadas en genes cromosomales, que son homólogos al sistema *czc* (Yoon, 1998). Se han reportado, además, distintos fenotipos de resistencia a Zn y a Cd en aislados con el operón *czc*, debido a diferencias en las secuencias de esos genes por mutaciones, deleciones, inserciones, entre otros (Hassan y col., 1999).

Este tipo de resistencia al ser codificada en genes cromosomales podría no ser transferida mediante el proceso de conjugación. En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que las cepas donantes no fueron capaces de transferir los marcadores de resistencia a Cd y Zn a la cepa receptora *E. coli* J62-2. Por lo que es posible que los aislados de *P. aeruginosa* estudiados, sean portadores del sistema *czc*.

Una forma de corroborar esto podría ser mediante la creación de una genoteca, o mediante PCR utilizando como cebadores secuencias de los genes de la bomba *czc*.

No obstante, la cepa *P. aeruginosa* PB12' fue capaz de transferir el marcador de resistencia a ampicilina con una baja frecuencia de transferencia ( $10^{-5}$ ), al igual que los controles positivos empleados en el proceso de conjugación. No se observó co-transferencia de los otros marcadores de resistencia a antibióticos para este aislado.

Una explicación posible para esto es que los determinantes de resistencia probados en las pruebas de co-transferencia se encontraban en el cromosoma bacteriano, o en otros plásmidos no conjugativos y, por tanto, no pudieron transferirse. También podría ser que se encontraran en otros plásmidos conjugativos, pero cuya transferencia no haya sido efectiva; o que se encontraran en el mismo plásmido, pero la cepa receptora carecía de la maquinaria enzimática necesaria para expresar el fenotipo de resistencia. Este último caso fue descrito en el trabajo de Kato y colaboradores (1977), donde se reportaron plásmidos portadores de genes de resistencia a gentamicina que no fueron capaces de conferir la resistencia al ser introducidos en cepas de *E. coli*. Podría suceder entonces, que PB12' presente diferentes moléculas plasmídicas con distinta maquinaria de conjugación.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son similares a los de Raja y Selvam (2009), que aislaron el DNA plasmídico de una cepa de *P. aeruginosa* resistente a Cd, Cr, Ni, Pb y ampicilina, e hicieron transformación de una cepa de *E. coli*. Ellos obtuvieron bacterias transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina y a Ni. Los genes de resistencia a Cd, Cr y Pb no fueron transferidos ya que eran codificados por genes cromosomales.

Es importante resaltar que este es el primer trabajo realizado en el LBPB del IBE, en el cual se utiliza de manera exitosa un aislado perteneciente a la especie *P. aeruginosa* como cepa donante del proceso de conjugación bacteriana (G. Alonso., Comunicación personal).

Algunos estudios de co-resistencia a metales pesados y antibióticos asocian la resistencia a Cd y Zn, con resistencia a antibióticos aminoglicósidos y carbapenémicos (Perron, 2004; Pal y col., 2017; Nguyen y col., 2019). Pero los resultados obtenidos en este trabajo no mostraron una relación entre la resistencia a Cd y a Zn y a los perfiles de resistencia a antibióticos. La resistencia a Cd y Zn puede ser causada por un mismo mecanismo codificado por genes cromosomales, mientras que la resistencia a ampicilina está codificada por genes plasmídicos; la del resto de antibióticos ensayados, pueden estar codificados a nivel cromosomal o plasmídico, encontrándose en un plásmido distinto.

Esto puede ser explicado por la presión selectiva presente en los ambientes originales de cada aislado. Los estudios que reportan co-resistencia a metales pesados y antibióticos, por lo general, son llevados a cabo en cepas provenientes de ambientes contaminados y no en aislados de origen clínico (Deredjian y col., 2011).

La frecuencia de cepas patógenas que presentan genes de resistencia a antimicrobianos ha aumentado en los últimos años, y muchas de ellas pueden encontrarse no solo en sus hospedadores, sino en el medio ambiente (Martínez y Baquero, 2002). Debido a que la temperatura difiere entre los nichos que estas cepas pueden habitar, es posible que el fenotipo de resistencia a antimicrobianos también varíe en función de la temperatura.

Aquellas especies bacterianas que pueden habitar distintos nichos, estarán sometidas a distintos rangos de temperaturas. La variación de este parámetro físico es capaz de alterar procesos biológicos fundamentales, como: el plegamiento proteico, la actividad enzimática, y la regulación de la expresión génica. Los mecanismos que permiten a las bacterias sobrevivir a los cambios de temperatura en su ambiente se encuentran asociados a: los cambios en la regulación de la expresión génica que promueven la síntesis de proteínas de choque térmico y factores de virulencia (Wey y Murphy, 2016).

En el estudio de Hinks y colaboradores (1977) se evaluaron las diferencias entre las MICs y las MBCs de *S. faecalis* a 30 °C y 37 °C para varios antibióticos, encontrando que los valores de MIC y MBC para penicilina, meticilina y bacitracina fueron más altos a 30 °C que a 37 °C; mientras que, para vancomicina, ristocetina y fosfomicina fueron similares a ambas temperaturas. La MIC y MBC de la cicloserina fue mayor a 37 °C que a 30 °C.

Por otro lado, en el estudio de MacFadden y colaboradores (2018), se estudió la correlación entre la temperatura ambiental mínima local en Estados Unidos y la resistencia a antibióticos de cepas bacterianas patógenas. Encontrando que un aumento de 10 °C en la temperatura mínima anual entre regiones, estuvo asociado con un incremento del más del 2,2 % en la resistencia bacteriana. Si bien no pudieron determinar causalidad, los datos parecen indicar que la temperatura ambiental es un factor influyente en la resistencia a antimicrobianos.

Ambas investigaciones sugieren que la temperatura puede alterar el fenotipo de resistencia a antibióticos de los microorganismos. No obstante, los estudios sobre el efecto de la temperatura en la resistencia bacteriana a metales pesados son escasos. Dentro de estos, destaca el trabajo de Khan y colaboradores (2015), en el cual se demostró que la bioacumulación de Cd en una cepa de *E. coli*, puede variar en función de la temperatura. El mayor porcentaje de bioacumulación (57 %) se obtuvo a 30 °C, mientras que el menor (2 %) se obtuvo a 42 °C.

Debido a que la temperatura es un factor importante en la caracterización de la resistencia a antimicrobianos, en especial para aquellos microorganismos que pueden colonizar distintos ambientes; y que los cationes de Cd y Zn son dos metales pesados contaminantes poco estudiados, en este trabajo se evaluó el fenotipo de resistencia a CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> a 25 °C, 37 °C y 42 °C, en aislados bacterianos gramnegativos clínicos, resistentes a

antibióticos, pertenecientes a las especies *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *K. pneumoniae*. Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad en medio líquido a distintas concentraciones de las sales de metales pesados, que se sembraron en placas de AN y AN suplementado con las sales de metales pesados, y se obtuvo el título luego de 48 h de incubación.

En este estudio, los resultados de viabilidad en función de la temperatura y en ausencia de metales pesados, mostraron que la temperatura puede ejercer un efecto sobre el título bacteriano de algunas cepas en la fase estacionaria de crecimiento. A 42 °C el título bacteriano de algunos aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* fue menor que a 25 °C y a 37 °C (Figura 9). Mientras que todos los aislados de *P. aeruginosa* tuvieron como temperatura óptima de crecimiento 25 °C. No obstante, es importante destacar que los títulos bacterianos se encontraron entre  $10^8$  y  $10^9$  UFC/mL en todos los casos, como era de esperarse para estos aislados en la fase estacionaria de crecimiento.

La temperatura es uno de los factores más importantes en el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. A medida que aumenta la temperatura, la velocidad de las reacciones químicas aumenta y también el crecimiento bacteriano. Pero, luego de cierto umbral, las proteínas son desnaturalizadas alterando su función, por lo que cada microorganismo tiene una temperatura óptima de crecimiento (Madigan y col., 2009).

Las tres especies de este estudio son bacterias mesófilas, y según Tsuji y colaboradores (1981), no presentan diferencias en su crecimiento a 25 °C, 30 °C, 37 °C y 42 °C. Sin embargo, en este trabajo se observaron variaciones entre cepas. Puede que para aquellos aislados que presentaron un título más bajo a 42 °C, esta temperatura estuviese por encima de su temperatura óptima, y por esto haya disminuido el contaje viable. Mientras que para las cepas de *P. aeruginosa* su temperatura óptima sea de 25 °C, la temperatura ambiente. Lo cual tiene sentido, ya que algunas provienen del ambiente hospitalario.

En este trabajo se evaluó además el efecto de la temperatura en presencia de CdCl<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos mostraron disminución de la viabilidad respecto al control en ausencia del tratamiento para las tres temperaturas ensayadas. Esta reducción fue mayor al 96 % para *E. coli* a 2,5 mM, al 99,7 % para *P. aeruginosa* a 5,6 mM y al 100 % para *K. pneumoniae* a 15 mM. Las concentraciones ensayadas fueron bactericidas en la mayoría de los casos, y no se observaron cepas resistentes que fuesen capaces de crecer en las placas suplementadas con CdCl<sub>2</sub>.

Las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> escogidas para este trabajo, fueron tomadas de la bibliografía para aislados provenientes de ambientes contaminados. Por lo que son concentraciones altas de este metal. Debido a que las concentraciones de Cd son mucho menores en el ambiente hospitalario, tiene sentido que la reducción de la viabilidad haya sido elevada, para estos aislados (Tabla XI).

No hubo diferencias significativas entre la FS de la mayoría de los aislados en presencia de CdCl<sub>2</sub>, respecto a *E. coli* J62-2 escogida como control negativo, indicando que fueron susceptibles al metal. Los aislados que presentaron una mayor viabilidad que el control negativo fueron: *E. coli* 3438 a 42 °C y *E. coli* 3663 a 25 °C en presencia de 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub>; *P. aeruginosa* PB12' a 37 °C y *P. aeruginosa* U387c a 37 °C en presencia de 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>. Estos resultados parecen indicar que la temperatura óptima de los aislados puede variar en presencia de CdCl<sub>2</sub>. En los ensayos en función de la temperatura de incubación, la temperatura óptima para los aislados de *P. aeruginosa* fue de 25 °C. Mientras que al añadir 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>, se observó mayor viabilidad a 37 °C.

Por otro lado, la cepa escogida inicialmente como control positivo por presentar resistencia a otros metales pesados, *P. aeruginosa* MPAO1, fue sensible a 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub> y 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>, por lo que fue descartada como control positivo para estos ensayos. Se

intentó utilizar *P. aeruginosa* PB12' como control positivo para el ensayo a 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub>, debido a que fue el aislado de *P. aeruginosa* que presentó mayor viabilidad a 5,6 mM de CdCl<sub>2</sub>. Sin embargo, este aislado presentó una menor FS a 2,5 mM que a 5,6 mM, lo cual sugiere que las colonias observadas luego del tratamiento a 5,6 mM fueron mutantes.

La cepa de *E. coli* J53, tampoco presentó resistencia a 2,5 mM de CdCl<sub>2</sub>, a diferencia de lo observado por Bruzual (2002). Es importante señalar que, además de las diferencias en los medios de cultivo comentadas previamente, la metodología utilizada en estos ensayos también fue distinta, puesto que la sal se agregó a un medio líquido y luego este cultivo fue titulado en placas de agar nutritivo, lo cual puede hacer que los resultados cambien.

Al comparar los valores del estadístico F de Fisher para el tratamiento con CdCl<sub>2</sub> a 25 °C, 37 °C y 42 °C, con cada uno de los niveles de tratamiento y sus interacciones, se pudo observar que la variable con mayor efecto sobre la viabilidad fue la concentración de CdCl<sub>2</sub>. Asimismo, se observó que, en la mayoría de los casos, el efecto individual de las variables fue menor que el efecto sinérgico entre las mismas. Esto tiene sentido porque las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> utilizadas fueron bactericidas o estuvieron muy cerca de serlo, y esto opacó el efecto de las otras variables y sus interacciones.

En los experimentos a 37 °C en presencia de distintas concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>, un aumento en la concentración de la sal, fue correspondido con una disminución en la viabilidad de los aislados. Los aislados de la especie *P. aeruginosa* comenzaron a ser viables y cultivables en un rango de concentraciones entre 7 mM y 17 mM; mientras que para los de *E. coli*, el rango estuvo entre 1 mM y 2 mM, y para *K. pneumoniae* entre 1,5 mM y 3 mM. Lo que sugiere que los aislados de *P. aeruginosa* son capaces de sobrevivir a mayores concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>. Estos resultados muestran la misma tendencia observada en los experimentos en medio sólido.

Al evaluar el efecto de la temperatura, se obtuvo que la supervivencia de los aislados fue menor a 37 °C que a 25 °C y 42 °C. Asimismo, los títulos bacterianos muestran que la mayor supervivencia se observó a 25 °C. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico de la FS, se observó que solo algunos aislados presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres temperaturas de estudio.

Las concentraciones utilizadas de ZnCl<sub>2</sub> fueron bactericidas para algunos aislados, y estuvieron muy cerca de serlo para otros. En estos casos por lo general no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los cultivos en función de la temperatura de incubación. Mientras que a concentraciones más bajas sí se observaron diferencias. Es importante realizar estos estudios a menores concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>, para poder determinar si hay un patrón o una tendencia en la resistencia a estos antimicrobianos en función de la temperatura de incubación.

Las concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> ensayadas a 37 °C fueron bactericidas para diez de los doce aislados estudiados, pero a 25 °C y 42 °C fueron bacteriostáticas para la mayoría de los aislados pertenecientes a las especies *E. coli* y *K. pneumoniae*. En estos casos, por lo general, la FS fue mayor a 25 °C que a 42 °C.

Una explicación posible para esto, podría ser la aclimatación de los aislados. La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* y de *K. pneumoniae* es de 37 °C (Madigan y col., 2009; Bengoechea y Sa Pessoa, 2019). No obstante, los aislados utilizados en esta investigación fueron obtenidos a partir de punciones almacenadas desde hace más de cuatro años a 25 °C. Algunos estudios han demostrado que, las poblaciones de *E. coli* tienen una ventaja competitiva cuando crecen en un entorno térmico durante varias generaciones y son aclimatadas a esta temperatura, en comparación con aquellas poblaciones que son aclimatadas a otra temperatura distinta (Schmid, 2014).

La exposición de los organismos a nuevos ambientes, puede causar cambios no genéticos y reversibles en la expresión de una variedad de rasgos fenotípicos, llamada plasticidad fenotípica. La aclimatación es un tipo de plasticidad fenotípica que ocurre al exponer a los organismos a nuevas temperaturas, lo cual puede en algunos casos, conferirles ventajas en el nuevo ambiente, respecto a los que no fueron aclimatados (Bennet y Lensky, 1997).

En el estudio de Bennet y Lenski (1997), se aclimataron poblaciones clonales de una cepa de *E. coli* a 32 °C y 37 °C, y luego crecieron mezclas de ambas poblaciones en medio líquido a las mismas temperaturas. Ellos obtuvieron que, al colocar las poblaciones aclimatadas en el medio a 37 °C, la población aclimatada a 37 °C tuvo mayor fitness, respecto a la población aclimatada a 32 °C. Sin embargo, al colocar las poblaciones aclimatadas en el medio a 32 °C, la población aclimatada a 37 °C siguió presentando mayor fitness, contrariamente a lo que esperaban. Ellos atribuyeron este resultado a que la temperatura evolutiva histórica, o el ambiente térmico en el cual esta cepa creció durante 2000 generaciones, era de 37 °C, y la aclimatación a esta temperatura, no solo fue capaz de incrementar el fitness a 37 °C, sino que también pudo extender los efectos beneficiosos de la aclimatación fenotípica a otros ambientes térmicos. Otros autores han obtenido resultados similares utilizando otros rangos de temperatura (Leroi y col., 1994; Schmid, 2014).

Los efectos beneficiosos de la aclimatación son más frecuentes cuando ha habido un historial de selección en el entorno térmico correspondiente. En este sentido, los aislados utilizados en este trabajo, al estar almacenados a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado, presentan un historial de selección a 25 °C, lo que les pudo haber conferido una ventaja en los experimentos realizados esta temperatura, en comparación con aquellos realizados a 37 °C y 42 °C, y por tanto hayan presentado mayor viabilidad a 25 °C.

Otra posibilidad es que la expresión de los genes que confieren resistencia a Zn varíe en función de la temperatura. Esto ha sido descrito en trabajos de resistencia a Hg en aislados bacterianos de origen ambiental (Tsai y Olson, 1990). Estos autores reportaron que los cultivos bacterianos a 4 °C en presencia de Hg<sup>2+</sup> presentaron mayor expresión y actividad de la enzima reductasa codificada por *merA*, que al realizar el experimento a 23 °C. Por otro lado, a 23 °C en ausencia de Hg<sup>2+</sup>, observaron producción constitutiva de la enzima reductasa.

Si bien, este estudio fue realizado con otro metal pesado y con distintas temperaturas de incubación, demuestra que los microorganismos pueden variar su fenotipo de resistencia a metales pesados dependiendo de la temperatura a la que se encuentren.

También, en el trabajo de Kropinski y colaboradores (1987), observaron que la cepa *P. aeruginosa* PAO incubada en un medio nutritivo en un rango de temperaturas entre 15 °C y 45 °C, presentó cambios en la composición de los lípidos, LPS y las proteínas de la membrana externa. Además, sugieren que estas modificaciones podrían afectar el fenotipo de resistencia a antimicrobianos. Esto también podría estar ocurriendo con los aislados de esta investigación.

Por otro lado, hubo algunos aislados que presentaron una dispersión muy alta en su FS, y es posible que sean mutantes. Por ejemplo, *K. pneumoniae* KP20 a 25 °C, que presentó una desviación estándar superior a la media (Tabla XIV).

Durante el tiempo de incubación en medio líquido, han podido aparecer mutantes resistentes a las sales de metales utilizadas, y al realizar el conteo de viables en el medio sólido, se observaron varias colonias que quizá partieron de un mismo evento mutacional. Entonces, dependiendo de si la mutación ocurrió en etapas tempranas, intermedias o tardías de la incubación del cultivo, cambiará el título de bacterias resistentes obtenido, y la variabilidad de los experimentos será alta.

Otro factor que pudo haber influido en la aparición de mutantes, es la fase de crecimiento en la cual se encontraban los aislados al momento de realizar estos experimentos. Esta investigación fue realizada con aislados bacterianos en fase estacionaria. Según Loewe y colaboradores (2003), la tasa de mutación es más alta durante la fase estacionaria que, durante la fase exponencial, debido a que la respuesta a la escasez de nutrientes induce mutagénesis. La tasa de mutación en la fase estacionaria probablemente está influenciada por varios factores, como las reacciones bioquímicas mediadas por la temperatura, el genotipo de la cepa y la dinámica poblacional de los diferentes mutantes que viven en la fase estacionaria. Lo cual explicaría por qué no todas las cepas que fueron capaces de sobrevivir al tratamiento con  $ZnCl_2$ , parecieran haber sido mutantes.

Por último, al igual que en los experimentos con  $CdCl_2$ , se observó que ninguno de los aislados fue capaz de permanecer viable y cultivable al sembrar en las placas suplementadas con  $ZnCl_2$ . Lo que indicó que ningún aislado fue capaz de resistir el tratamiento continuado.

Dentro del campo de la resistencia a metales pesados, un problema metodológico importante es la falta de MICs y MBCs en condiciones estándar que permitan comparar los resultados entre varios laboratorios. Algunos sesgos técnicos de la determinación de la MIC y la MBC son el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, y la composición del medio de cultivo (Kiem y Schentag., 2006).

En este trabajo no se pudo obtener un valor exacto de MBCs, para los aislados estudiados. Es necesario probar más concentraciones de ambos metales. Sin embargo, con los resultados reportados, se puede observar que las MBCs muestran la tendencia de ser superiores a la MICs. Esto tiene sentido, ya que la MIC está relacionada con la actividad bacteriostática del antimicrobiano, y la MBC con la actividad bactericida. Para eliminar una

población bacteriana se requieren concentraciones más altas que para inhibir su crecimiento. De hecho, los agentes antibacterianos generalmente se consideran bactericidas si la MBC es menor a cuatro veces la MIC (Goins, 2017).

Otra dificultad surge, debido a que la mayoría de los estudios realizados en resistencia bacteriana a metales pesados, carecen de análisis estadísticos que permitan corroborar las conclusiones presentadas por sus autores. A medida que aumente la cantidad de información con respaldo estadístico respecto a la resistencia bacteriana a metales pesados, será más sencillo establecer protocolos experimentales específicos. Así como también desarrollar políticas de protección medioambiental y de salud pública que ayuden a evitar el esparcimiento de los genes de resistencia a metales pesados en las poblaciones de microorganismos.

Se evidencia entonces la necesidad de continuar estudiando la resistencia bacteriana a antimicrobianos, y los factores que influyen en este fenotipo, en conjunto con sus mecanismos de resistencia, de tal forma de prevenir la diseminación de bacterias resistentes en el ambiente, que puedan ser causantes de infecciones difíciles o imposibles de tratar.

## 8. CONCLUSIONES

- Los aislados pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* presentaron resistencia a 1 mM de CdCl<sub>2</sub>, y los aislados pertenecientes a las especies *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron sensibles a concentraciones iguales o superiores a 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub>.
- Los aislados *P. aeruginosa* MPAO1 y PB12', presentaron resistencia a 3 mM de ZnCl<sub>2</sub>, y *P. aeruginosa* N242 presentó resistencia a 1 mM de ZnCl<sub>2</sub>. Los aislados pertenecientes a las especies *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron sensibles a concentraciones iguales o superiores a 1 mM de ZnCl<sub>2</sub>.
- Las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> empleadas fueron bactericidas en todos los ensayos.
- La viabilidad de los aislados bacterianos de estudio disminuyó a medida que se incrementaron las concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> en el medio de cultivo.
- El efecto tóxico del ZnCl<sub>2</sub> puede variar en función de la temperatura de incubación. El efecto del Zn A 37 °C fue bactericida para 10 de los 12 aislados estudiados. Mientras que a 25 °C y 42 °C fue bacteriostático para 5 de 12 aislados.
- No hubo transferencia de los marcadores de resistencia a CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> de los aislados bacterianos resistentes a la cepa receptora, en ninguno de los ensayos realizados mediante el proceso de conjugación bacteriana.

## 9. RECOMENDACIONES

- Continuar el estudio de resistencia a metales pesados y antibióticos en aislados bacterianos de origen clínico y de origen ambiental, para evaluar si el incremento en las concentraciones de metales pesados en el ambiente está promoviendo la selección de los marcadores de resistencia a antibióticos en las comunidades de microorganismos.
- Estudiar los mecanismos de resistencia a Cd, a Zn y a otros metales pesados en distintas temperaturas, ya que la temperatura es un factor poco estudiado, pero que puede alterar el fenotipo de resistencia a antimicrobianos.
- Realizar ensayos de viabilidad en función de la temperatura de incubación, a concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> y de CdCl<sub>2</sub> cercanas a las concentraciones a las cuales están expuestos los microorganismos en su ambiente. A concentraciones más altas podrían opacarse los efectos de la temperatura.
- Realizar estudios de resistencia bacteriana a metales pesados, con significancia estadística para corroborar los resultados obtenidos.
- Realizar estudios de MICs y MBCs en distintos medios de cultivo, con distintos tamaños de inóculo y distintos tiempos de incubación, para establecer protocolos de determinación de estos parámetros que puedan ser reproducibles en distintos laboratorios.
- Evaluar el efecto del CdCl<sub>2</sub> y del ZnCl<sub>2</sub> sobre la viabilidad de aislados bacterianos en distintas fases de crecimiento para evaluar las diferencias que presentan.

- Evaluar el efecto del  $\text{CdCl}_2$  y del  $\text{ZnCl}_2$  sobre la viabilidad de aislados bacterianos formando biopelículas, para tener una mejor aproximación de las interacciones que tienen los microorganismos con estos metales en el ambiente que habitan.
- Realizar estudios de biorremediación de ambientes contaminados con bacterias resistentes a metales pesados.
- Reducir la descarga de metales pesados en el ambiente, para evitar la diseminación de los genes de resistencia a estos antimicrobianos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Adama, M., Esena, R., Fosu-Mensah, B., Yirenya-Tawiah, D. 2016. Heavy Metal Contamination of Soils around a Hospital Waste Incinerator Bottom Ash Dumps Site. *J Environ Public Health*. Article ID 8926453. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8926453>.

Allen, H., Donato, J. Huimi Wang, H., Cloud-Hansen, K., Davies, J., Handelsman, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews*. **8**: 251-259.

Alonso, G., Narvaez, P., Toba, F., Gomes, C., Pedroza, R., Rodríguez-Lemoine, V. 2001. Caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes de Venezuela. *Memorias del IBE*. **3**: 93-96.

Alonso, G., Malaver, E., Guzmán, M., Rodríguez-Lemoine, V. 2005. Caracterización de Plásmidos e Integrones presentes en bacterias multirresistentes aisladas en diferentes ambientes en Venezuela. *Memorias del IBE*. **4**: 81–84.

Altin, A., Altin, S., Degirmenci, M. 2003. Characteristics and treatability of hospital (medical) wastewaters. *FEB*. **12(9)**: 1098 – 1108.

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

Arif, T., Mudsser, A., Siddiqui, K., Arif, A., Inho, C., y Mohd, Q., Rizwanul, H., 2015. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int. J. Mol. Sci*. **16**: 29592–29630.

Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., McArthur, J. V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends microbiol*, **14(1)**: 176–182.

Barer, M. R., Harwood, C., R. 1999. Bacterial Viability and Culturability. *Adv Microb Physiol*. **41**: 93-137.

Bazdikian, E. 2013. Prevalencia y trasmisibilidad 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.

Beltrán, M., Gómez, A. 2015. Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. *Revista I3+*. **2(2)**: 82 – 112.

Beltrán, M., Gómez, A. 2016. Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. **12(2)**: 172-197.

- Bengoechea, J., Sa Pessoa, J. 2018. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol. Reviews.* **43(2)**: 123-144.
- Bennett, A. F., Lenski, R. E. 1997. Evolutionary Adaptation to Temperature. VI. Phenotypic Acclimation and Its Evolution in *Escherichia coli*. *Evolution.* **15(1)**: 36-44.
- Binet, M., Poole, R. 2000. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Letters.* **473**: 67-70.
- Binti, N. 2011. Removal of heavy metal in medical institution wastewater using ultrasonic assisted various leaching solution. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. University Malaysia Pahang.
- Blanc, D. S., Petignat, C., Janin, B., Bille, J., Francioli, P. 1998. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect* **4**: 242–247.
- Block, S. 2001. Disinfection, sterilization and preservation. 5ta Edición. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiol.* **14**: 320 - 330.
- Brown, T., LeMay, E., Bursten, B., Murphy. 2009. Química: La Ciencia Central. Decimoprimer edición. Editorial Pearson Education. Naucalpan de Juarez, Mexico.
- Bruzual, I. 2002. Análisis de determinantes de Resistencia a metales tóxicos presentes en plásmidos del IncHI3 e IncII. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., Arechaga, I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Reviews.* **39**: 81-95.
- Chalbaud, A. 2010. Caracterización epidemiológica de bacterias causantes de infecciones nosocomiales. Tesis doctoral. Universidad Simón Bolívar. Miranda, Venezuela.
- Chang, J. S., Hong, J., Oa, O., Bh, O. 1993. Interaction of mercuric ions with the bacterial growth medium and its effects on enzymatic reduction of mercury. *Biotechnol. Progr.*, **9**: 526-532.
- Chang, R y College, W. 2002. Química. Séptima Edición. Editorial McGraw-Hill. Mexico D.F., Mexico.
- Chandra, R. 2015. Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste. CRC Press, Primera Edición, Boca Raton, Florida, E.U.A.
- Chen, S., Li, X., Guo-Xin, S., Zhang, Y., Qiang, J., Jun, Y. 2015. Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in Bacterium LSJC7. *Int. J. Mol. Sci.* **16(10)**: 23390-23404.

- Cipullo, S., Prpich G., Campo, P., Coulon, F. 2018. Assessing bioavailability of complex chemical mixtures in contaminated soils: Progress made and research needs. *Science of the Total Environment* **615**: 708–723.
- Covarrubias, S. A., García Berumen, J. A., & Peña Cabriales, J. J. 2015. El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, **25(3)**: 40-45.
- Davies, C. B.; Harrison, M. D., Huygens, F. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Trent and zinc homeostasis. *FEMS Microbiology Letters*. **364(16)**: 1-6.
- Deredjian, A., Colinon, C., Brothier, E., Favre-Bonté, S., Cournoyer, B., Nazaret, S. 2011. Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.* **162(7)**: 689–700.
- Derici, K., Buzkaya, H., Sahin, F., 2012. The possible role of Zinc compounds on the cytotoxicity of latex Foley urinary catheters. *Turk Hij Den Biyol Derg.* **69(1)**: 21 – 30.
- Dickinson, A. W., Power, A., Hansen, M. G., Brandt, K. K., Piliposiane, G., Applebye, P., O'Neil, P. A., Jones, R. T., Sierocinska, P., Koskella, B., Vosi, M. 2019. Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. *Environ. Int.* **132**: 1 – 10.
- Dionisio, F., Gama, J. A., Carvalho, A. 2015. Symbiosis Between Non-Transferable Plasmids and Prokaryotic Cells. *Reticulate Evolution*. **3**: 191-205.
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B., Rai, J., Kumar, P., Lade, H., Paul, D. 2015. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*. **7**: 2189-2212.
- Hinks, E. T., Daneo-Moore, L., Braverman, S. 1977. Temperature Effects on Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations of Cell Wall Antibiotics in *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12(2)**: 281-283.
- Ilangovan, A., Connery, S., Waksman, G. 2015. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends microbiol.* **23(5)**: 301-310.
- Irwin, R. 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia: Zinc Entry. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, CO.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B., Beeregowda, K. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* **7(2)**: 60–72.
- Jang, J., Hur, H., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T., Ishii, S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications, a review. *J Appl Microbiol* **123**: 570-581.

Flora, S., Mittal, M., Mehta, A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* **128**: 501–523.

Goins, M. 2017. Minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) evaluations as R&D tools. *Q Laboratories*. [Consulta el 12/02/2019].

Gómez, W., Ball, M., Botello, W., Yarzabal L. 2013. Horizontal transfer of heavy metal and antibiotic-resistance markers between indigenous bacteria, colonizing mercury contaminated tailing ponds in southern Venezuela, and human pathogens. *RSVM.* **33**:110-115.

Gupta, A., Joia, J., Sood, A., Sood, R., Sidhu, C., Kaur, G. 2016. Microbes as Potential Tool for Remediation of Heavy Metals: A Review. *J Microb Biochem Technol.* **8(4)**: 364-372.

Guzmán, M. 2006. Caracterización de los determinantes de codifican  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae* (Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”). Tesis Doctoral en Biología Celular. Facultad de Ciencias, UCV.

Hassan, M. E. T., van der Lelie, D., Springael, D., Romling, U., Ahmed, N., Mergeay, M., 1999. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* **238**: 417–425.

Hassen, A. Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A. 1998. Resistance of environmental. Bacteria to heavy metals. *Bioresour. Technol.* **64**: 7-15.

Hussain, W., Mumtaz, A., Yasmeen, F., Khan, S. Q., Butt, T. 2014. Reference range of zinc in adult population (20–29 years) of Lahore, Pakistan. *J Med Sci.* **30(3)**: 545-548.

John, D.A., Leventhal, J.S., 1995. Bioavailability of metals. *United States Geological Survey.* **2**: 10–18.

Kang, D., Kirienkoa, D. R., Webster, P., Fisher, A. L., Kirienko, N. V. 2018. Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. *Virulence.* **9(1)**: 804–817.

Karbasizaed, V., Badami, N., Emtiazi, G. 2003. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *Afr. J. Biotechnol.* **2 (10)**: 379-383.

Kato, T., Sato, Y., Iyobe, S., Mitsuhashi, S. 1982. Plasmid-Mediated Gentamicin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and Its Lack of Expression in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **22(3)**: 385 -363.

Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C., R., Barer, M. R. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**: 169–187.

- Khan, Z., Hussain, S. Z., Rehman, A., Zulfiqar, S., Shakoori, A.R. 2015. Evaluation of Cadmium Resistant Bacterium, *Klebsiella pneumoniae*, Isolated from Industrial Wastewater for its Potential Use to Bioremediate Environmental Cadmium. *Pakistan J. Zool.* **47(6)**: 1533-1543.
- Khan, Z., Nisar, M. A. Hussain, S. Z., Arshad, M. N., Rehman, A. 2015. Cadmium resistance mechanism in *Escherichia coli* P4 and its potential use to bioremediate environmental cadmium. *Appl Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-015-6901-x.
- Kiem, S., Schentag, P. 2006. Relationship of Minimal Inhibitory Concentration and Bactericidal Activity to Efficacy of Antibiotics for Treatment of Ventilator-Associated Pneumonia. *Semin Resp Crit Care.* **27(1)**: 51-67.
- Kropinski, A., Lewis, V., Berry, D. 1987. Effect of Growth Temperature on the Lipids, Outer Membrane Proteins, and Lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **169(5)**: 1960-1966.
- Kumar, R., DK, P., Kumar, R. 2004. A survey of Trace Metals Determination in Hospital Waste Incinerator in Lucknow City, India. *JHAS.* **3(2)**: ISSN 0972-5997.
- Leroi, A. M., Bennett, A. F., Lenski, R. E. 1994. Temperature acclimation and competitive fitness: An experimental test of the beneficial acclimation assumption. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**: 1917-1921.
- Leroi, A. M., Lenski, R. E., Bennett, A. F. 1994. Evolutionary adaptation to temperature. III. Adaptation of *Escherichia coli* to a temporally varying environment. *Evolution.* **48**: 1222- 1229.
- Li, J., Xie, S., Ahmed, S., Wang, F., Gu, Y. 2017. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *Front. Pharmacol.* p:1-11.
- Loewe, L., Textor, V., Scherer, S. 2003. High Deleterious Genomic Mutation Rate in Stationary Phase of *Escherichia coli*. *Science.* **302**: 1558-1559.
- Low, K. B. 2001. Encyclopedia of Genetics. Elsevier Science Inc. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270800002676> [Consulta 6 de mayo de 2018].
- MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M., Brownstein, J. S. 2018. Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nat. Clim. Change.* <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0161-6>.
- Maddison, J., Watson, D. J., Elliott, J. 2008. Antibacterial drugs. Principles of antibacterial therapy. 148-185.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap P., Clark D. 2009. Brock biología de los microorganismos. Pearson Educación. Madrid, España.

- Malik, A., Aleem, A. 2011. Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ Monit Assess.* **178**: 293–308.
- Maret, W., Wedd, A., 2014. RSC Metallobiology Series No. 2: Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Martínez, J. L., Baquero, F. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* **15(4)**: 647-679.
- Mayo Clinic Laboratories. 2019. Test ID: ZNU. Zinc, 24 Hour, Urine. Consultado en: [<https://www.mayocliniclabs.com/testcatalog/Clinical+and+Interpretive/8591#targetText=Normal%20daily%20excretion%20of%20zinc,to%20967%20mcg%2F24%20hour.>]
- McDevitt, C., Ogunniyi, A. D., Valkov, E., Lawrence, M. C., Kobe, B., McEwan, A. G., Paton, J., C. 2011. A Molecular Mechanism for Bacterial Susceptibility to Zinc. *PLoS Pathog* **7(11)**: e1002357.
- Meesungnoen, O., Nakbanpote, W., Thiwthong, R., Thumanu, K. 2012. Zinc and Cadmium Resistance Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PDMZnCd2003. *Res. J. Biol. Sci.* **7(1)**: 4-13.
- Mejía, G. 2006. Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* **1(1)**: 77 – 99.
- Mielkarz, L., Smolinska, B. 2017. Zinc and nano-ZnO – influence on living organisms. *Biotechnol Food Sci.* **81 (2)**: 93-102.
- Moradali, M. F., Ghods, S., Rehm, B. H. A. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Cell. Infect. Microbiol.* **7(39)**:1-29.
- Nathan, C. & Cars, O. 2014. Antibiotic resistance problems, progress, and prospects. *N. Engl. J. Med.* **371**: 1761–1763.
- Nguyen, C. C., Hugie, C. N., Kile, M. L., Navab-Daneshmand, T. 2019. Association between heavy metals and antibiotic-resistant human pathogens in environmental reservoirs: A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* **13(3)**: 46.
- Norman, A., Hansen, L. H., Sørensen, S. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **364**: 2275–2289.
- NRC Committee (National Research Council Committee on bioavailability of contaminants in soils and sediments). 2003. Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, tools, and applications. Washington, DC: The National Academic Press.
- Olaniran, A., Balgobind, A., Pillay, B. 2013. Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 10197-10228.

Paczosa, M., Meccas, J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**:629–661.

Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D., Larsson, D. G., Hobman, J. 2017. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Adv Microb Physiol.* **1(1)**: 261-313.

Pankey, G. A., Sabath, L. D., 2004. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *CID.* **69(9)**: 864-870.

US patent 7759327B2. Consultado en: <https://patents.google.com/patent/US7759327B2>. [Consulta 15 de septiembre de 2019].

Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J., Kohler, T. 2004. CzcR-CzcS, a Two-component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* **279(10)**: 8761–8768.

Peterson, E., Kaur, P. 2018. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol.* **9**: 1-21.

Pletnev, P., Osterman, I., Sergiev, P., Bogdanov, A., Dontsova, O. 2015. Survival Guide: *Escherichia coli* in the Stationary Phase. *Acta Naturae.* **7(4)**: 22-33.

Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., Soren, T., Maiti, T. K. 2017. Characterization of cadmium-resistant *Klebsiella pneumoniae* MCC 3091 promoted rice seedling growth by alleviating phytotoxicity of cadmium. *Environ Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-017-0033-z [Consulta 14 de abril de 2018].

Raja, C., Sasikumar, S., Selvam, G. 2008. Adaptive and cross resistance to cadmium (II) and zinc (II) by *Pseudomonas aeruginosa* BC15. *Biologia.* **63(4)**: 461-465.

Raja, C., Selvam, G. 2009. Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **6 (2)**: 259-266.

Raja, C., Selvam, G. 2012. Characterization of chromosomal mediated cadmium resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strain BC15. *J. Basic Microbiol.* **52**: 175–183.

Ruiz-Masó, J. A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M., del Solar, G. 2015. Plasmid rolling-circle replication. *Microbiol Spectrum.* **3(1)**: PLAS-0035-2014.

Sanabria, Z. Estudio del fenotipo y la transmisibilidad de la resistencia a Vanadio en aislados de *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Sandle, T. 2016. Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology.*

- Schmid, P. 2014. Temperature effects on evolutionary rates of *Escherichia coli* with a growth advantage in stationary phase (GASP) phenotype. Master Thesis. Institute of Evolutionary Biology and Environmental Studies. University of Zurich.
- Seiler, C., Berendonk, T. U. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol.* **3**: 339.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M., Grossart, H. P. 2003. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.* **4(47)**: 1-13.
- Sinha, S., Kumar., S. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1, a possible candidate for cadmium bioremediation. *Braz. J. Microbiol.* **40**: 655-662.
- Strateva, T., Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*, a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* **58**: 1133–1148.
- Su, C., Jiang, L., Zhang, W. 2014. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Env. Skeptics and Critics.* **3(2)**: 24-38.
- Tsai, Y., Olson, B. 1990. Effects of Hg<sup>2+</sup>, CH<sub>3</sub>-Hg<sup>+</sup>, and Temperature on the Expression of Mercury Resistance Genes in Environmental Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(11)**: 3266-3272.
- Tsuji, A. Kaneko, Y. Takahashi, K. 1982. The Effects of Temperature and pH on the Growth of Eight Enteric and Nine Glucose Non-Fermenting Species of Gram-Negative Rods. *Microbiol. Immunol.* **26(1)**: 15-24.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y. 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances.* **26**: 266-291. [http:// 10.1016/j.biotechadv.2008.02.002](http://10.1016/j.biotechadv.2008.02.002). [Consulta 15 de abril de 2018].
- Vullo, D. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva.* **2(3)** ISSN 1666-7948. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm> [Consulta el 16 de abril de 2018].
- Wang, C., Michels, P., Dawson, S., Kitisakkul, S., Baross, J., Keasling, J., Clark, D. 1997. Cadmium Removal by a New Strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(10)**: 4075–4078.
- Wasi, S., Tabrez, S., Ahmad, M. 2013. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environ Monit Assess.* **185(4)** ISSN 0167-6369.
- Wawrzyniak, P., Płucienniczak, G., Bartosik, D. 2017 The Different Faces of Rolling-Circle Replication and Its Multifunctional Initiator Proteins. *Front. Microbiol.* **8**: 2353.
- Wei, Y., Murphy, E. 2016. Temperature-Dependent Regulation of Bacterial Gene Expression by RNA Thermometers. Chapter 6. INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/61968>.

Whitacre, D. 2014. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Editorial Springer. Suiza.

World Health Organization. 2014. *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance*. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. [Consulta 15 de abril de 2018].

Yagnentkovsky, N. 2011. *Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.

Yoon, K.P., 1998. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. KM10 a cadmium, and mercury-resistant, and phenol degrading bacterium. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 388–398.

Zapata, D. 2015. *Estudio del fenotipo y la transmisibilidad de la resistencia a vanadio, en bacterias causantes de infecciones en el tracto urinario*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.