



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIÓLOGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS DE MAESTRÍA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA**

**RESISTENCIA A METALES Y VANCOMICINA EN AISLADOS  
CLÍNICOS DE *Escherichia coli* DIARREAGÉNICA Y SU RELACIÓN  
CON LA FUENTE DE CARBONO.**

**Presenta:**

**M.V.Z. Juan José Guzmán Martínez**

**Directora: D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas**

**Morelia, Michoacán.**

**Mayo, 2007.**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y con el apoyo económico del proyecto 12027 de Fondos mixtos CONACYT-Gobierno del Estado de Michoacán y del proyecto 16.4 apoyado por la Coordinación de Investigación Científica de la U.M.S.N.H.

**AVANCE CON CONFIANZA  
EN LA DIRECCIÓN DE SUS SUEÑOS  
Y ESFUÉRCESE POR VIVIR LA VIDA  
QUE SIEMPRE HA IMAGINADO,  
Y SE ENCONTRARÁ CON UN ÉXITO INESPERADO  
EN UNA CUANTAS HORAS.**

*Henry David Thoreau*

## DEDICATORIA

*Al ídolo que es una persona muy especial, que siempre he querido ser como él, que me ha apoyado en todo y se esfuerza por darnos lo mejor cada día, a mi padre M.V.Z. Juan José Guzmán López.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la D. en C. Ma Soledad Vázquez Garcidueñas, por aceptar ser mi asesora de Tesis de maestría, además de su amistad y sus consejos.

A la D. en C. Virginia Robinson Fuentes, por aceptar ser parte de mí comité tutorial, por sus enseñanzas en sus clases y las observaciones realizadas a este trabajo, además de su amistad.

A la D. en C. Bertha Fenton Navarro, por aceptar ser parte de mí comité tutorial, por sus enseñanzas en sus clases y las observaciones realizadas a este trabajo, además de su amistad.

Al D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo, por aceptar ser parte de mí comité tutorial, por las observaciones realizadas a este trabajo, además de la amistad que me ha brindado,

A mis hermanos Lic. Eric Nain Guzmán Martínez y Michael Amir Guzmán Martínez.

A mi novia Ana Gaona Aguilar.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice General.....	6
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tablas.....	11
Índice de Anexos.....	12
RESUMEN.....	13
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
I.1. Diarrea.....	15
I.1.1 Morbilidad y mortalidad.....	15
I.1.2 Agentes etiológicos.....	15
I.2 <i>E. coli</i> como agente diarreagénico.....	15
I.2.1 clasificación.....	16
I.3 Antibióticos.....	17
I.3.1 Clasificación.....	17
I.3.2 Resistencia a antibióticos.....	18
I.3.3 Vancomicina.....	19
I.4 Metales.....	21
I.4.1 Resistencia a metales.....	22
I.5 Biolog en estudios de <i>E. coli</i> .....	26
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJERTIVOS PARTICULARES.....	29
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>V. ESTRATEGIA.....</b>	<b>29</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
VI.1 Material biológico.....	30
VI.2 Tamaño de muestra.....	30
VI.3 Ensayos de susceptibilidad.....	30
VI.3.1 Metales pesado.....	30

VI.3.2 Vancomicina.....	31
VI.4 Uso del sistema Biolog.....	31
VI.4.1 Fluido de inoculación.....	31
VI.4.2 Obtención del preinoculo.....	31
VI.4.3 Preparación de la suspensión con metales pesados y vancomicina..	32
VI.4.4 Inoculación e incubación de las microplacas Biolog.....	32
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
VII.1 Sensibilidad a metales.....	34
a) Cobre.....	34
b) Plata.....	36
c) Plomo.....	39
VII.2 Sensibilidad a Vancomicina.....	40
VII.3 Efecto de los metales pesados sobre los niveles de crecimiento y metabolismo de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica .....	42
a) Cobre.....	42
b) Plata.....	44
c) Plomo.....	45
VII.4 Efecto de la vancomicina sobre los niveles de crecimiento y metabolismo de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	47
VII.5 Análisis de agrupamiento del efecto de los metales (cobre, plata y plomo) y vancomicina, en la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	49
VII.6 Análisis de agrupamiento de las fuentes de carbono utilizadas para el crecimiento y metabolismo de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en presencia de metales y antibiótico.....	50
VII.7 Análisis de agrupamiento de las fuentes de carbono sobre la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en metales y antibiótico.....	52
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>60</b>

**XI. BIBLIOGRAFÍA..... 76**



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1 Modo de acción de la vancomicina.....	20
2 Conjunto de membranas asociadas a captación, eflujo, reducción y oxidación de iones de metales pesados.....	21
3 Genes que confieren resistencia al plomo para un microorganismo específico, R-metallidurans de tipo CH34.....	24
4 Transporte y resistencia a cobre en <i>E. coli</i> .....	25
5 Fuentes de carbono de una microplaca GN2 (para bacterias Gram Negativas).....	33
6 Crecimiento de <i>E. coli</i> diarreagénica en medio LBA con cobre.....	34
7 Porcentaje de aislados de <i>E.coli</i> diarreagénica sensibles al cobre.....	36
8 Crecimiento de <i>E. coli</i> diarreagénica en medio LBA con plata.....	36
9 Porcentaje de aislados de <i>E.coli</i> diarreagénica sensibles a plata.....	38
10 Crecimiento de <i>E. coli</i> diarreagénica en medio LBA con plomo.....	38
11 Porcentaje de aislados de <i>E.coli</i> diarreagénica sensibles al plomo.....	40
12 Crecimiento de <i>E. coli</i> diarreagénica en medio LBA con vancomicina.....	40
13 Porcentaje de aislados de <i>E.coli</i> diarreagénica sensibles a la vancomicina.	42
14 Efecto del cobre sobre la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en las fuentes de carbono a las 24h. ....	43
15 Análisis de agrupamiento del efecto del cobre sobre la fisiología de los aislados de <i>E. coli</i> diarreagénica en distintas fuentes de carbono.....	43
16 Efecto de la plata sobre la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en distintas fuentes de carbono.....	44
17 Análisis de agrupamiento del efecto de la plata sobre la fisiología de las	

cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica de las fuentes de carbono.....	45
18 Efecto del plomo sobre la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en distintas fuentes de carbono.....	46
19 Análisis de agrupamiento del efecto del plomo sobre la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en las fuentes de carbono.....	47
20 Efecto de la vancomicina sobre la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en las fuentes de carbono .....	48
21 Análisis de agrupamiento del efecto de la vancomicina sobre la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	49
22 Análisis de agrupamiento de los metales (cobre, plata y plomo) y vancomicina, en la fisiología de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	49
23 Análisis de agrupamiento de las fuentes de carbono en el crecimiento de <i>E. coli</i> diarreagénica en presencia de metales y antibiótico.....	51
24 Análisis de agrupamiento del efecto de las fuentes de carbono en el metabolismo de <i>E. coli</i> diarreagénica presencia de metales y antibiótico.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
I Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> .....	18
II CMI a la cual los iones de metales pesados son tóxicos.....	22
III Mecanismos y sistemas de resistencia bacteriana a metales pesados.....	25
IV Sensibilidad a cobre de los aislados clínicos de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	35
V Sensibilidad a plata de los aislados clínicos de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	37
VI Sensibilidad a plomo de los aislados clínicos de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	39
VII Sensibilidad a vancomicina de los aislados clínicos de <i>E. coli</i> diarreagénica.....	41
VIII Agrupamiento de las fuentes de carbono de acuerdo a su uso por las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica, en presencia de los diferentes compuestos.....	52

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
I Matriz dicotómica con los datos de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en las fuentes de carbono, en presencia de cobre 2 mM a las 24h.....	59
II Matriz dicotómica con los datos de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en las fuentes de carbono, en presencia de plata 0.025 mM a las 24h.....	61
III Matriz dicotómica con los datos de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en las fuentes de carbono, en presencia de plomo 1.25 mM a las 24h.....	63
IV Matriz dicotómica con los datos de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica en las fuentes de carbono, en presencia de vancomicina 0.08 µg a las 24h.....	65
V Matriz dicotómica con los datos de metabolismo de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica de las fuentes de carbono, en presencia de cobre 2 mM a las 24h.....	67
VI Matriz dicotómica con los datos de metabolismo de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica de las fuentes de carbono, en presencia de plata 0.025 mM a las 24h.....	69
VII Matriz dicotómica con los datos de metabolismo de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica de las fuentes de carbono, en presencia de plomo 1.25 mM a las 24h.....	71
VIII Matriz dicotómica con los datos de utilización de metabolismo de las cepas de <i>E. coli</i> diarreagénica de las carbonos, en presencia de vancomicina 0.08 µg a las 24h.....	73

## RESUMEN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la diarrea es uno de los cinco problemas principales de salud pública. México es una de las naciones que registra a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas y ocupa el primer lugar de muertes en niños menores de 5 años de edad. La diarrea puede tener etiologías no infecciosas e infecciosas, estas últimas, pueden ser causadas por virus, parásitos o bacterias, entre las que se encuentra *Escherichia coli*. Recientemente se ha incrementado la resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por enterobacterias, aunado a esto está el hecho de que varios de los mecanismos de resistencia a antibióticos y a metales se comparten, por lo que una resistencia puede llevar a la otra, además de que los resultados pueden variar dependiendo del medio en el cual se encuentren creciendo las bacterias. La profundización en el conocimiento acerca de la sensibilidad a antibióticos y a metales permitirá proporcionar una mejor terapia a los pacientes y poder tomar medidas preventivas en cuanto a posibles fuentes de infección.

El objetivo de este trabajo fue establecer la relación entre la fisiología (metabolismo y crecimiento) y la respuesta a factores de estrés químico en cepas diarreagénicas de *E. coli*. Para lo cual, se trabajó con cepas diarreagénicas de referencia de *Escherichia coli* ETEC-LT (HI0407), ETEC-ST (25611), EIEC (E11), EPEC (0111) y 13 aislados clínicos de *E. coli* enterotoxigénica, provenientes de heces de niños con diarrea aguda. A estas bacterias, se les evaluó la sensibilidad a cobre, plomo, plata y vancomicina en medio LBA, en todos los casos conforme se fue aumentando la concentración del compuesto probado, fue disminuyendo el crecimiento, con el siguiente grado de toxicidad: Pb < Cu < Ag. También se analizó la respuesta de los aislados a vancomicina, antibiótico prescrito para bacterias GRAM positivas y encontramos que todos los aislados mostraron cierto grado de sensibilidad a dicho antibiótico. Mediante el uso del sistema BIOLOG, se analizó, el efecto de dichos metales y de la vancomicina sobre el crecimiento y el metabolismo, de los distintos aislados, observándose que el Cu fue el metal que presentó mayor efecto. Las fuentes de carbono indispensables tanto para el crecimiento como el metabolismo de los aislados de *E. coli* diarreagénica en presencia de cobre, plata, plomo o vancomicina a las 24 h, son los aminoácidos. Los datos que se obtuvieron en este trabajo, muestran que la presencia de distintas fuentes de

carbono genera una respuesta diferencial a los factores de estrés químico en cepas de *E. coli* diarreagénica. Sin embargo, la respuesta también está mediada por las diferencias genéticas entre los aislados.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

### **I.1 Diarrea**

**I.1.1 Morbilidad y mortalidad.** En los países en desarrollo, las enfermedades diarreicas representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político. La diarrea, es una de las mayores causas de morbilidad, con ataques de proporciones que van de 2 a 12 o más episodios por persona por año, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Nguyen y col., 2005). Entre los niños menores de 5 años de edad, ocurren mil millones de episodios de diarrea todos los años (Ryan y col., 2005). La OMS estimó que 2.1 millones de personas mueren anualmente por diarrea (Cardonha y col., 2004). En los países en vías de desarrollo, causan de 2 a 2.5 millones de muertes y se estima que en Asia, África y América Latina las enfermedades diarreicas provocan en los niños menores de 5 años de edad, 12,600 muertes cada día (Nguyen y col., 2005). México es una de las naciones que registra a nivel mundial, las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos, siendo considerable el costo tanto en vidas humanas y recursos médicos destinados a la atención de los enfermos, como en pérdidas de tiempo laborable, ya que constituyen una de las primeras causas de ausentismo laboral. La Secretaría de Salud informó que en el período de 1993 a 1997, de 2.95 millones de personas con enfermedades de origen alimentario, tuvieron lugar un promedio anual de 10,300 defunciones, además de cuantiosos gastos en atención médica, pérdidas económicas y laborales (Varga y Del Barrio, 2005). En México, las enfermedades infecciosas intestinales ocupa el primer lugar, en las causas de mortalidad en edad preescolar (de 1 a 4 años) en el 2003 (Secretaría de Salud, 2003).

**I.1.2 Agentes etiológicos.** Los enteropatógenos virales, bacterianos y parasitarios están asociados actualmente con la diarrea aguda. Los rotavirus y *Escherichia coli* son los patógenos más comunes y responsables de los episodios de diarrea aguda en niños menores de 5 años.

### **I.2 *E. coli* como agente diarreagénico.**

*E. coli* es una enterobacteria que permanece confinada normalmente en el lumen

intestinal; sin embargo, durante el debilitamiento, la inmunosupresión del hospedero o cuando las barreras gastrointestinales son traspasadas, cada cepa normal de *E. coli*, puede ser patógena causando enfermedades intestinales (Nataro y Kaper, 1998). El interés clínico por las infecciones causadas por *E. coli* diarregénica ha tenido un incremento importante en años recientes (Teng y col., 2004) ya que se encuentra comúnmente en el tracto intestinal del humano y animales, en agua, comida y es además responsable de tres tipos de infecciones en los humanos, del tracto urinario (UTI), meningitis neonatal y las enfermedades intestinales (la gastroenteritis).

### **I.2.1 Clasificación**

*Escherichia coli* puede clasificarse en base a su antigenicidad en serogrupos y serotipos, (somático o antígenos O para los serogrupos y flagelar o antígenos H para los serotipos). Muchas cepas expresan una tercera clase de antígenos (capsular o antígenos K) que aunque importante en la patogénesis sólo de vez en cuando se usa en la serotipificación (Campos y col. 2004). Se reconocen alrededor de 700 serotipos en base a los antígenos O, H, y K.

Las cepas de *E. coli* diarregénica se clasifican en seis grandes categorías, *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), que a su vez se subclasifica en LT (con toxina termolábil) y ST (con toxina termoestable), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusamente adherida (DAEC) (Torres y col., 2005). La EPEC ha sido dividida en EPEC típica (t-EPEC) y EPEC atípica (a-EPEC) (Campos y col., 2004).

Todos los estudios reportados para identificar patotipos de *E. coli* en población mexicana, se han realizado durante epidemias, sin embargo Carreras-Villaseñor (2004) encontró mediante ensayos Southern y amplificaciones PCR que de 54 aislados de *E. coli*, provenientes de heces de niños con diarrea de la ciudad de Morelia y recolectadas en un periodo no epidémico, el 33% eran *E. coli* enterotoxigénica y de estas, el 94% pertenecía al grupo ST y el resto al grupo LT. En estas mismas muestras, Rosales Castillo (2004) utilizando RAPD's encontró que los aislados de un mismo patotipo presentan gran diversidad genética.



### **I.3 Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y originan su destrucción (Cué y Morejón, 1998).

#### **I.3.1 Clasificación.**

Aunque los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos. Las múltiples clasificaciones existentes presentan diferentes características y han sido realizadas basándose en disímiles criterios:

1.- Según la actividad que tienen los antibióticos frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, éstos pueden clasificarse en: antibióticos contra Gram (+), antibióticos contra Gram (-) y antibióticos de amplio espectro que abarca a ambos.

2.- Según el efecto de su acción sobre las bacterias, los antibióticos se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, y depende de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisar la bacteria, respectivamente. Esta clasificación es bastante inexacta, pues estos términos varían dependiendo del tipo de la bacteria y de la concentración del antibiótico.

3.- Dependiendo del mecanismo de acción para actuar sobre los microorganismos, los antibióticos se clasifican en:

- a) Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana y afectan la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana
- b) Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal.
- c) Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos.
- d) Agentes antimetabólicos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico.
- e) Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo

4.- Según sus estructuras químicas, es la más utilizada en la literatura científica. Se fundamenta en la similitud química de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas, en dependencia también de las adiciones de grupos químicos que posean en dichos núcleos base (Cué y Morejón, 1998).

### I.3.2 Resistencia a antibióticos

Con el fin de defenderse de los antibióticos, los microorganismos han desarrollado mecanismos para neutralizar o destruir sus propios antibióticos. La resistencia puede ser una propiedad inherente a un microorganismo o puede adquirirla. La existencia de genes de resistencia a antibióticos implica que, bajo las condiciones adecuadas, es posible transferir esta resistencia a otros organismos (Brock y col., 2003)

Hay tres estrategias mediante las cuales, las bacterias patógenas desarrollan la resistencia a los fármacos. (1) Producir una enzima que degrade el fármaco, (2) alterar el blanco molecular del fármaco, de manera que se vuelven insensibles al mismo, o (3) evitar el acceso del fármaco a su blanco mediante, por ejemplo, el bombeo activo del fármaco fuera del interior de la célula. Cuando el patógeno desarrolla una estrategia efectiva, los nuevos genes, mutados o adquiridos que confieren la resistencia, son diseminados por medio de los plásmidos al conjunto de la población de patógenos, siendo incluso transferidos a patógenos de otra especie que son tratadas con el mismo fármaco (Bruce y col., 2004). En *E. coli* se han documentado cinco mecanismos de resistencia a antibióticos (Tabla I) (Brock y col., 2003).

**TABLA I. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *E. coli***

MECANISMO DE RESISTENCIA	EJEMPLO DE ANTIBIÓTICO	BASE GENÉTICA DE LA RESISTENCIA
Permeabilidad reducida	Penicilinas	Cromosómica
Inactivación del antibiótico	Penicilinas, cloranfenicol	Plasmídica, cromosómica
Alteración del blanco (RNA polimerasa)	Rifampicina, Estreptomycin, Norfloxacin	Cromosómica
Desarrollo de una vía bioquímica resistente	Sulfonamidas	Cromosómica
Eflujo	Tetraciclinas	Plasmídica

(Brock y col., 2003).

En los países en vías de desarrollo, el aumento progresivo de la resistencia a antibióticos de patógenos entéricos se ha vuelto un área de preocupación. El incremento en el uso clínico de estos agentes antimicrobianos ha llevado a un aumento en la tasa de la resistencia bacteriana, ocasionando un problema importante en el tratamiento de varios patógenos bacterianos comunes (Nguyen y col, 2005). Los pacientes hospitalizados tienen un alto riesgo a las infecciones ya que el ambiente del hospital favorece la adquisición de agentes resistentes a los antimicrobianos (Karbasizaed y col., 2003).

La mayoría de las diarreas que son causadas por *E. coli*, se tratan con antibióticos comunes como gentamicina, ampicilina, amikacina trimetoprim-sulfametaxazol y cloranfenicol, entre otros. Sin embargo, los viajes a los países en vía de desarrollo están asociados con un incremento elevado de enfermedades diarreicas, causada por la ingestión de patógenos entéricos, específicamente de *E. coli* resistente a gentamicina, kanamicina, estreptomina, sulfonamida, trimetoprima (TMP) y sulfametoxazol más TMP (SMX -TMP) (Murray y col, 1990) y sensibles a Piperacilina, Piperacilina/tazobactama, Cefotaxima, Cefotaxidima, Cefepima (Dzierżanowska y col., 2005). En el caso específico de *E. coli* 0157, esta cepa ha surgido como una amenaza de salud pública, ya que presenta una alta resistencia a tetraciclina, sulfametoxazol, cefalotina y ampicilina (Schroeder, 2002). La multiresistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* enterotoxigénica, *E.coli* enteroagregativa o de *E.coli* enteropatógena, se ha encontrado tanto en niños menores de 5 años de edad con diarrea (Vila y col., 1999), como en niños sanos (Pallecchi y col., 2004).

Existen reportes de multiresistencia a antibióticos tanto en aislados patógenos de *E. coli* (Rosales-Castillo, 2004) como en aislados provenientes de pacientes no diarreicos (Mojica-Hernández, 2006). Entre los antibióticos a los cuales se presenta multiresistencia están la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT).

### **1.3.3 Vancomicina**

De acuerdo con la estructura de la pared celular, las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. Una de las principales diferencias entre estos dos tipos de estructura radica en la composición en

peptidoglicano. Mientras que en las bacterias Gram positivas el peptidoglicano representa el 50-90% de la pared celular, en las gramnegativas sólo constituye una pequeña proporción de ésta, en la que predominan fosfolípidos, proteínas y polisacáridos. Así, la pared celular de las bacterias Gram positivas es especialmente vulnerable a la acción de los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglicano (Farreras, 2000).

La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular en bacterias sensibles al unirse con las terminaciones D-alanil-D-alanina de alta afinidad de las unidades precursoras de la pared (fig. 1) (Hardman y Limbird, 2005). La vancomicina es un glucopéptido tricíclico complejo con una masa molecular de aproximadamente 1,500 Da. (Hardman y Limbird, 2005) y se recomienda para el uso clínico, de infecciones de bacterias Gram positivas (Gao, 2001).

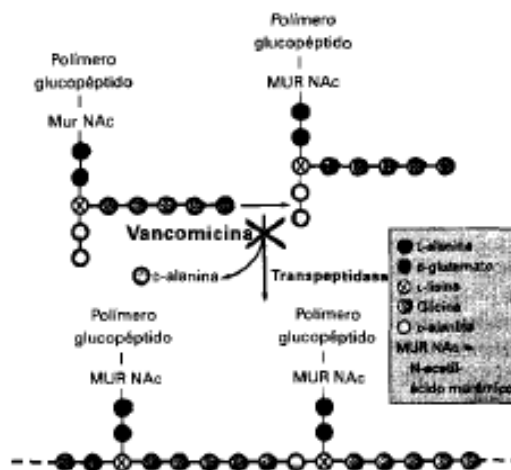


Figura 1. Modo de acción de la vancomicina (Hardman y Limbird, 2005).

En los años 80, fue descrito el primer reporte de enterococos resistentes a los glicopéptidos que rápidamente se dispersaron en Estados Unidos. En 1996 fue aislada en Japón la primera cepa de MRSA (*S. aureus* resistente a meticiclina) con susceptibilidad intermedia a vancomicina. La cepa VISA (*S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina) ahora se encuentra en todo el mundo. El Centro de prevención y control de enfermedades en Estados Unidos, reportó en el 2000, que tres cepas de MRSA con alto nivel de resistencia a los glicopéptidos, habían adquirido el transposón responsable para la resistencia a glicopéptidos en enterococos, una de esas

cepas fue aislada, de un paciente, que no fue expuesto a vancomicina, pero sí a otros antibióticos, los cuales pudieron proveer una presión selectiva de una colonización de un promotor, por un enterococo resistente a vancomicina y MRSA por transferencia horizontal (Bambeke, 2004).

Los estudios recientes de susceptibilidad a vancomicina en *E. coli* son muy escasos, ya que comúnmente dicho antibiótico no se emplea en esta especie debido a que es Gram negativa. En un estudio en Tokio donde se evaluó la microflora intestinal de 45 cuervos, el 21.6 % de los aislados obtenidos fue *E. coli*, siendo la especie más frecuente. Al evaluar la susceptibilidad de los aislados de *E. coli* hacia 14 de los mejores agentes antimicrobianos, todos fueron resistentes a penicilina G, eritromicina, lincomicina, bicozamicina, sulfadimetoxina, olaquinox e incluso a la vancomicina y varios de esos mismos aislados también fueron resistentes a tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomicina, cloramfenicol y ampicilina (Aruji y col., 2004).

De manera interesante, en un estudio reciente en el cual se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de distintos aislados vaginales incluyendo a *E. coli* en el 10.2% de los aislados de obtenidos se encontró una sensibilidad de estos a piperacilina-tazobactam, imipenem y vancomicina (Tariq y col., 2006). Así, la vancomicina puede ser activa contra algunos aislados clínicos de *E. coli*, revelando posiblemente diferencias sutiles en la arquitectura de la pared celular en dichas cepas.

#### **I.4 Metales.**

Los cationes de metales juegan un papel importante en reacciones bioquímicas sofisticadas, semejantes a las que fijan el nitrógeno durante la fotosíntesis, la asimilación de hidrógeno, la hidrólisis de la urea, la transcripción de genes (Silver and Phung, 2005). Sin embargo, una alta concentración de iones de metales pesados o de compuestos complejos inespecíficos en la célula, encabezan los efectos tóxicos. Los cationes divalente  $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Ag^{+}$  forman complejos tan tóxicos que son peligrosos para algunas funciones biológicas. De igual forma, metales como  $Zn^{+2}$  o  $Pb^{+2}$  y especialmente  $Cu^{+2}$  son tóxicos a altas concentraciones (Dehesa, 1991). Para tener un efecto tóxico, los iones del metal pesado deben entrar primero en la célula. Algunos metales pesados son necesarios para las funciones enzimáticas y el crecimiento

bacteriano, por lo tanto existen los mecanismos de captación y eso permite la entrada de iones metálicos en la célula. Hay dos sistemas de captación (Tabla II), uno es rápido e inespecífico, manejado por un gradiente quimiostático por la membrana de la célula y no requiere ATP, el otro es más lento y específico al sustrato, manejado por la energía de hidrólisis del ATP. El primer mecanismo produce la entrada de una variedad más amplia de metales pesados cuando estos metales están en concentraciones altas (Spain, 2003).

Una vez dentro de la célula, el metal pesado con alto número atómico, sobre todo el catión, tiene tendencia a unirse con grupos SH, como es el caso de  $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Ag^+$ . La CMI (concentración mínima inhibitoria) de estos iones metálicos tiene la función de disociar un complejo constante de los sulfuro respectivamente (Tabla III).

**TABLA II. CMI a la cual los iones de metales pesados son tóxicos**

MIC (mM)	Iones de metal pesado
0.02	$Ag^+$ , $Au^{3+}$
1.0	$Cu^{+2}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Zn^{2+}$
5.0	$Pb^{+2}$ , $Ir^{3+}$ , $Os^{3+}$ , $Cr^{3+}$ , $Be^{2+}$
10.0	$Cr^{2+}$

MIC; concentración mínima inhibitoria; ( $Ag^+$ ) plata; ( $Au^{3+}$ ) oro; ( $Cu^{+2}$ ) cobre; ( $Co^{2+}$ ) cobalto; ( $Ni^{2+}$ ) níquel; ( $Zn^{2+}$ ) Zinc; ( $Pb^{+2}$ ) plomo; ( $Ir^{3+}$ ) iridio; ( $Os^{3+}$ ) osmio; ( $Cr^{3+}$ ) cromo; ( $Be^{2+}$ ) berlio; ( $Cr^{2+}$ ) cromo (Silver and Phund, 2005).

Algunas bacterias han desarrollado mecanismos de desintoxicación a metales pesados (Spain, 2003). Dichos mecanismos comprenden la exclusión, la excreción, el secuestro y la transformación, los cuales son principalmente activos e inducidos en la presencia de metales pesados (Keasling y Hupf, 1996).

#### **I.4.1 Resistencia a metales**

##### **a) Mecanismos de resistencia a metales pesados**

Existen tres mecanismos que provocan la resistencia a metales (Fig. 2, Tabla III):

1. Atrapamiento de los metales.
2. Transformaciones redox a través de enzimas.
3. Expulsión de los metales por bombas (especial para plata) (Cervantes, 2006).

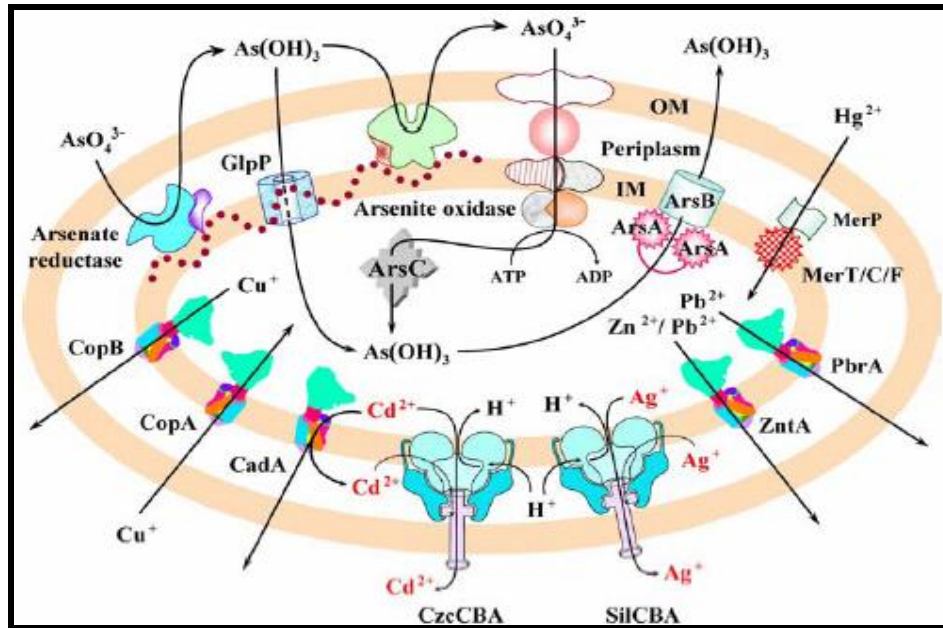


Figura 2. Conjunto de membranas asociadas a la captación, eflujo, reducción y oxidación de iones de metales pesados. (Silver S, 2005).

Todavía no está claro si existe un simple mecanismo de resistencia al plomo o si son diferentes los mecanismos en diferentes tipos de bacterias. Uno de los mecanismos más conocidos es el que presenta *R. metallidurans*, que involucra la presencia de seis genes distintos (Silver and Phung, 2005).

Los seis genes dentro de la región de resistencia al plomo (fig. 3). Están organizado en dos operones divergentes de transcripción con una región promotor/operador (con 19 nucleótidos entre el -10 y -35 unidas a la RNA polimerasa que actúa favorablemente en forma bidireccional de la transcripción. La transcripción de izquierda a derecha es realizada induciblemente al adicionar el plomo. PbrT parece ser una proteína de membrana de la clase de las “permeasas”, ésta puede transportar hacia fuera el plomo (captación). PbrD, es una proteína intracelular unida a plomo. La eliminación de PbrD, baja la acumulación de plomo a los niveles de células sensibles. Los genes de extrema derecha y extrema izquierda codifican para un mecanismo de resistencia basado en la expulsión (eflujo). El primer gen que está en el operón PbrABCD es PbrA que codifica para un amplio grupo de ATPasas tipo-P que bombea hacia fuera el metal libre. La PbrA ATPasa tipo-P, presenta secuencias que se comparten con todas las ATPasas tipo-P. La PbrB ATPasa es una lipoproteína de membrana, que ayuda en la eliminación del plomo que es bombeado por PbrA en el

compartimiento periplásmico. PbrC podría ser la peptidasa, que remueve los péptidos de una proteína resistente al plomo transportada hacia el espacio periplásmico, probablemente PbrB (Silver and Phung, 2005).

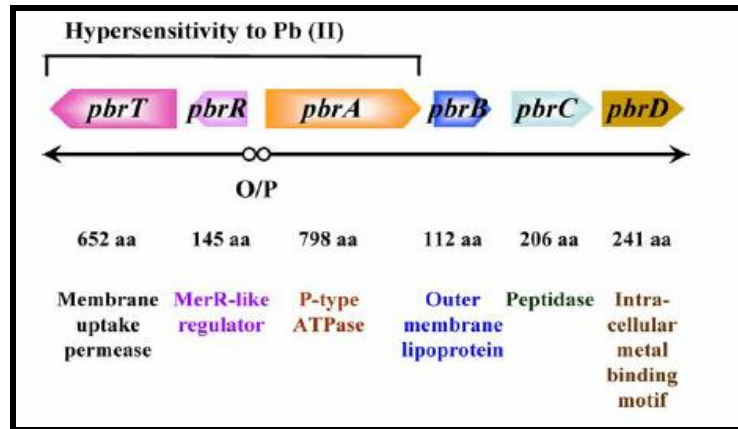


Figura 3. Genes que confieren resistencia al plomo para un microorganismo específico, *R-metallidurans* de tipo CH34

Debido a sus papeles celulares críticos y participación en las enzimas que activan la reducción/oxidación, el transporte del cobre y su resistencia ha sido estudiada ampliamente en años recientes, especialmente en *E. coli* y *Enterococcus hirae*. El cobre es diferente de los cationes ya que ambos,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+}$  experimentan una reducción al unirse al transporte y al equilibrio homeostático. El  $\text{Cu}^{2+}$  es más abundante en el medio ambiente aerobio así como el entorno extracelular y es menos tóxico que  $\text{Cu}^{+}$  el cual es intracelular (aunque no como un catión libre). Esto es, no se sabe si la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$ , ocurre cerca de la superficie celular, antes del transporte, durante o en la superficie de la membrana citoplasmática (Silver and Phung, 2005).

*E. coli* crece en niveles milimolares de  $\text{Cu}^{2+}$ , (Fig. 4) y es resistente a una concentración de 0.25 mM de cobre (Marine, 1991) en comparación con las cianobacterias, una clase diferente de bacterias Gram negativas, que se inhibe con concentraciones micromolares bajas. Esto además es confuso en condiciones de resistencia y bombas de eflujo. CopA es la ATPasa de eflujo de tipo-P de *E. coli* (fig. 4) responsable de mantener el cobre intracelular a bajas concentraciones, así que probablemente no haya una señal libre de  $\text{Cu}^{2+}$ , esto presenta un equilibrio y prefiere una cinética unidireccional donde hay un equilibrio dominante y homeostasis en las



concentraciones de cobre (Silver and Phung, 2005).

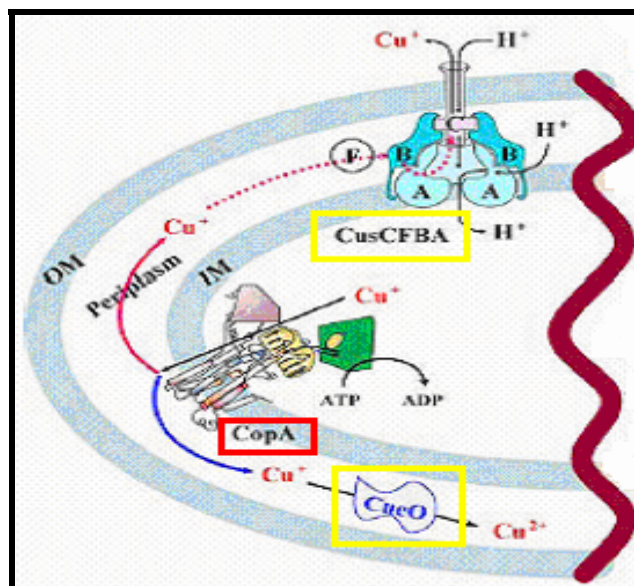


Figura 4. Transporte y resistencia a cobre en *E. coli*

(Rensing C y col, 2003)

**Tabla III. Mecanismos y sistemas de resistencia bacteriana a metales pesados**

Iones tóxicos	Gen memórico	Función de la proteína
Hg <sup>2+</sup> y organomercuriales	<i>mer</i>	Transporte y reductasa de Mercurio
AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> y As(OH) <sub>3</sub>	<i>ars</i>	Transporte y reductasa de Arsenato
As(OH) <sub>3</sub>	<i>aso</i>	Transporte y oxidasa de Arsenito
AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	<i>arr</i>	Reductasa respiratoria de Arsenato
Cd <sup>2+</sup>	<i>cad</i>	Bomba de ATPasa Tipo P
Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	<i>czc</i>	Emanación CBA de la Permeasa
Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	<i>cnr</i>	Emanación CBA de la Permeasa
Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	<i>ncc</i>	Emanación CBA de la Permeasa
Ni <sup>2+</sup>	<i>nre</i>	Emanación CBA de la Permeasa
→ Cu <sup>2+</sup> , Cu <sup>+</sup>	<i>cop</i> y <i>pco</i>	Transporte y resistencia a Cobre
→ CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<i>chr</i>	Emanación del cromato por Permeasa
→ Ag <sup>+</sup>	<i>sil</i>	Unión y resistencia a la Plata
→ Pb <sup>2+</sup>	<i>pbr</i>	Producto y resistencia al Plomo
TeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	<i>tel</i> , <i>teh</i> o <i>kil</i>	Resistencia a Tellurite

(Silver and Punhg, 2005).

Los iones de plata son sumamente tóxicos para todos los microorganismos, quizá debido al efecto del metal durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria y sobre los componentes de la replicación del ADN. El sistema de resistencia a Ag<sup>+</sup> estudiado más profundamente es el plásmido de *Salmonella* pMG101

que contiene nueve genes. El 10 % de las bacterias colectadas al azar en Chicago presentó plásmidos con genes de resistencia a Ag<sup>+</sup>.

Grandes porciones de tierra agrícola contienen altas concentraciones de distintos metales ya que son contaminadas mediante actividades naturales y antropogénicas, como los procesos industriales y las prácticas agrícolas, incluyendo el uso de fertilizantes que contienen varios metales como el plomo y el cadmio a los cuales las comunidades bacterianas se encuentran expuestas, razón por la cual la resistencia a metales pesados incluyendo la resistencia a plata se encuentra expuesta en el medio ambiente, lo que podría proporcionar la selección, además, la concentración elevada de un metal en el suelo, afecta la resistencia de los microorganismos a otros metales (Silver y Phung, 2005). El efecto del daño de los metales pesados ha sido detectado, por las mediciones de la tolerancia con las microplacas BIOLOG (Niklinska y col., 2006). Aunado a esto, en bacterias patógenas, la resistencia a antibióticos, suele ir asociada a la resistencia a metales pesados (Cardona y col., 2004).

Por otro lado, en estudios hechos con aislados de *E. coli* provenientes de pacientes no diarreicos con problemas gastrointestinales y diagnósticos clínicos variados (Mojica Hernández, 2006) se encontró que los niveles más altos de resistencia se presentaron en presencia de plomo (40 mM). En el caso de la plata, el 100% de los aislados fue resistente a 0.100 mM pero sensibles a 0.250 mM y con respecto a cobre, el 10% de los aislados fue resistente a 2.8 mM.

### **1.5 Biolog en estudios de *E. coli*.**

En la actualidad existen diversos sistemas para analizar las capacidades metabólicas de bacterias, uno de los cuales es el sistema Biolog<sup>®</sup>. El sistema de placas Biolog GN consiste en placas de microtítulo que contienen 95 fuentes de carbono distintas. Dicho sistema fue desarrollado para la identificación de aislados microbianos con base en la capacidad de estos para oxidar las diferentes fuentes de carbono (Bochner, 1989). Posteriormente, las placas Biolog GN fueron empleadas para la caracterización funcional (Garland y Mills, 1991) y el análisis de la estructura (Smalla y col., 1998) de comunidades microbianas. El sistema Biolog ha sido utilizado como estrategia para identificar contaminación fecal en agua (Hagerdon y col., 2003). El

análisis de comunidades microbianas con el sistema Biolog ha sido optimizado empleando *E. coli* como organismo de prueba (Gamo y Shoji, 1999). Sin embargo, aunque el sistema Biolog se encuentra actualmente incorporado como una herramienta de rutina en algunos laboratorios de diagnóstico, el único reporte que existe del uso del Biolog como método de identificación de aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica, y como estrategia para el análisis de diversidad de aislados provenientes de heces es el de Rosales Castillo (2004) quien encontró que existe una alta diversidad metabólica entre distintos aislados clínicos de *E. coli* enterotoxigénica.

## II. JUSTIFICACIÓN

No se conocen los factores nutricionales que contribuyen a que *E. coli* sea sensible a vancomicina y a metales.

No se sabe si existe una relación entre la sensibilidad a vancomicina y la sensibilidad a metales.

Es posible identificar en las cepas patógenas de *E. coli*, los factores de detoxificación, que le otorgan resistencia a distintos antibióticos, optimizando con ello los tratamientos.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general.

Establecer la relación entre el metabolismo y la respuesta a factores de estrés químico en cepas de *E. coli* diarreagénica.

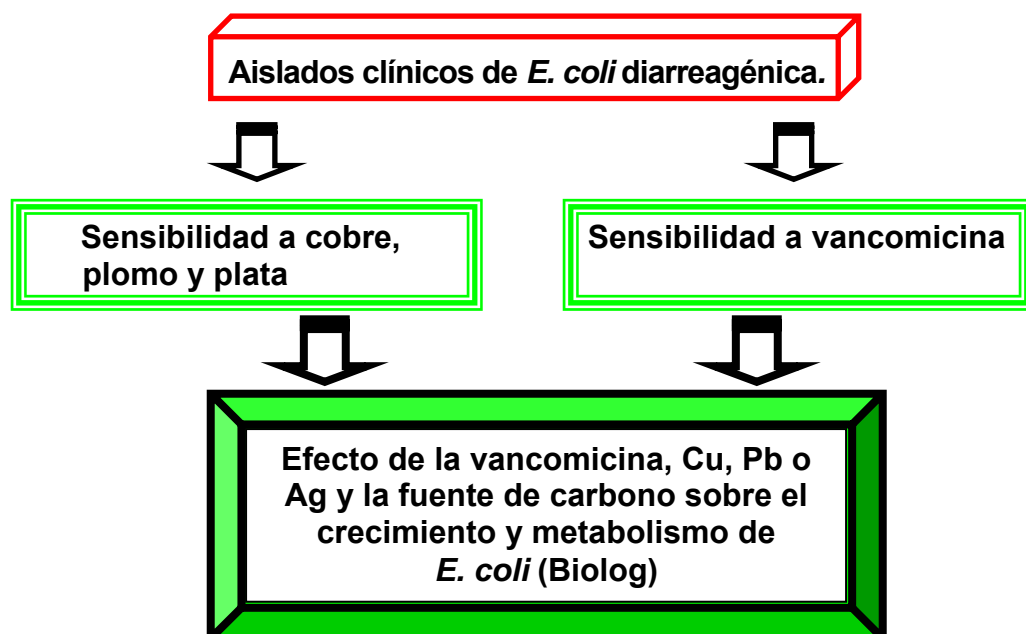
#### Objetivos particulares.

- Determinar la resistencia a vancomicina en los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica.
- Conocer la resistencia a metales en aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica.
- Analizar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica.
- Determinar el efecto de distintas fuentes de carbono sobre la resistencia a vancomicina y a metales tóxicos.

### IV. HIPÓTESIS

La presencia de distintas fuentes de carbono, genera una respuesta diferencial a factores de estrés químico, en aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica.

### V. ESTRATEGIA.



## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **VI.1 Material biológico.**

En este trabajo se utilizaron las cepas de referencia de *Escherichia coli* ETEC-LT (HI0407), ETEC-ST (25611), EIEC (E11), EPEC (0111) y aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica, adquiridas en el InDRE.

### **VI.2 Tamaño de muestra.**

Se estudiaron 13 aislados de *E. coli* diarreagénica provenientes de heces de niños con diarrea aguda.

### **VI.3. Ensayos de sensibilidad**

#### **VI.3.1 Metales pesados**

La sensibilidad de las bacterias a los metales pesados (Cobre, Plata y Plomo), se determinó por duplicado mediante el método de difusión en disco, utilizando cajas de Petri con medio LBA (Agar Luria-Bertani) con el metal a distintas concentraciones según el ensayo. El medio se preparó agregando al LBA, distintos volúmenes de las soluciones 100 mM de cada metal: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O J.T BAKER®, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> J.T BAKER®, y AgNO<sub>3</sub> J.T BAKER® esterilizadas previamente por filtración a través de membranas de 0.45 µm y se conservaron en frascos ámbar a 4° C por no más de 7 días (Bowler y col., 1955), a fin de lograr las siguientes concentraciones: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O: 2, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6 y 3.8 mM; AgNO<sub>3</sub>: 0.025, 0.05 0.1, 0.15 y 0.2 mM; Pb(NO<sub>3</sub>): 1.25, 2.5, 5 y 10 mM

Las placas se inocularon con cada uno de los aislados como se menciona a continuación. Con un hisopo estéril de algodón, se toca una colonia previamente aislada y a continuación, en una placa nueva, se estría en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie del agar, para obtener un inóculo uniforme; al finalizar se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar. La caja de Petri se incubó a 37 °C por un tiempo de 24 horas. Si se observa crecimiento, la cepa es resistente y se procede a realizar otra prueba con una concentración mayor, hasta que ya no se observe crecimiento de la cepa, entonces se determina la sensibilidad o

resistencia. Esto para cada metal (Norma M. y col., 1984).

### **VI.3.2 Vancomicina**

La sensibilidad a vancomicina se realizó de acuerdo al método de kirby-Bauer que consiste en Inocular una placa con LBA, distribuyendo una muestra de cultivo uniformemente por toda la superficie del agar y después colocando sobre la placa, discos de papel filtro. En cada disco se colocan, volúmenes crecientes de la solución 0.01 µg de vancomicina (esterilizada por filtración a través de una membrana de 0.45µm y conservada en un frasco ambar a 4° C por no más de 7 días (Bowler y col., 1955). Después de 15 min de haber colocado la solución de vancomicina, la caja de Petri se incuba a 37 °C por un tiempo de 24 horas. Se anota la presencia y el tamaño de las zonas de inhibición alrededor de los discos y se comparan con datos estándar recomendado por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990), para establecer si el aislado es verdaderamente sensible a vancomicina.

## **VI.4. Uso del sistema BIOLOG**

### **VI.4.1 Fluido de Inoculación**

Se prepara agregando Gellan Gum (Phytigel) 0.2 g a un litro de agua hirviendo y agitando constantemente, hasta que el Gellan Gum esté completamente disuelta y se retira del calor continuando con la agitación, se agregan 4 g de NaCl y se continúa agitando, se agregan 0.3 g de ácido Plurónico F68. Se deja enfriar a 45 °C y se distribuye en volúmenes de 16mL en tubos de 20 con tapa de rosca, finalmente se esteriliza con calor húmedo a 121°C/15lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos.

### **VI.4.2 Obtención del preinóculo**

Se siembra la cepa de interés en medio LBA (Medio Luria-Bertani), estriando por cuadrantes para obtener colonias aisladas y se incuba 24 h a 37 °C, posteriormente se resiembra en el medio de crecimiento universal de Biolog, BUG<sup>TM</sup> Agar (Biolog, Inc.), se estría nuevamente por cuadrantes y se incuba durante 24 h a 37 °C.

#### **VI.4.3 Preparación de la suspensión con los metales pesados y del antibiótico.**

Se prepara un inóculo líquido, usando el fluido de inoculación (FI) designado por el fabricante como GN/GP-IF, agregando los metales pesados (Cobre, Plata y Plomo) o vancomicina en la concentración determinada con anterioridad de resistencia para cada metal. El inóculo líquido se ajusta a una densidad de 61% de transmitancia (T) como se indica a continuación. El turbidímetro que se calibra a 0% T, con un estándar de turbidez designado como GN-ENT & AN, posteriormente se humedece un hisopo estéril en el FI y se levantan las colonias bacterianas del agar mediante un desplazamiento por rotación, cuidando de no arrastrar agar, se sumerge el hisopo en el FI para resuspender las colonias. Se tapa el tubo y se invierte cuidadosamente para no producir burbujas y para homogenizar el inóculo. Este procedimiento se repite hasta tener una densidad de 61% T ( $\pm 2\%$ ).

#### **VI.4.4 Inoculación e incubación de las microplacas Biolog.**

El inóculo preparado se vierte en un reservorio de pipeta multicanal estéril y se colocan 150  $\mu\text{L}$  en cada uno de los 96 pozos de una microplaca Biolog para bacterias aeróbicas Gram negativas designada como GN2, (fig. 5) y se incuba a 37 °C realizando lecturas a 590nm (Color - metabolismo) y 750nm (Turbidez - crecimiento) a las 24 h posteriores a la incubación de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Los resultados de utilización de sustratos en cada uno de los pozos de la microplaca, se reportan como 0 cuando no hay cambio de color en el pozo o como 1 cuando se ve cambio de color. Con estos datos se construye una matriz dicotómica de 0 y 1.



A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 Dextrin	A4 Glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine	A9 Adonitol	A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D-Cellobiose
B1 l-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α-D-Glucose	B7 m-Inositol	B8 α-D-Lactose	B9 Lactulose	B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose
C1 D-Melibiose	C2 p-Methyl-D-Glucoside	C3 D-Palucose	C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turanose	C10 Xylitol	C11 Pyruvic Acid Methyl Ester	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D1 Acetic Acid	D2 Cis-Aconitic Acid	D3 Citric Acid	D4 Formic Acid	D5 D-Galactonic Acid Lactone	D6 D-Galacturonic Acid	D7 D-Gluconic Acid	D8 D-Glucoosaminic Acid	D9 D-Gluconic Acid	D10 α-Hydroxybutyric Acid	D11 β-Hydroxybutyric Acid	D12 γ-Hydroxybutyric Acid
E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid	E2 Itaconic Acid	E3 α-Keto Butyric Acid	E4 α-Keto Glutaric Acid	E5 α-Keto Valeric Acid	E6 D,L-Lactic Acid	E7 Malonic Acid	E8 Propionic Acid	E9 Quinic Acid	E10 D-Succinic Acid	E11 Sebacic Acid	E12 Succinic Acid
F1 Bromosuccinic Acid	F2 Succinamic Acid	F3 Glucuronamide	F4 L-Alaninamide	F5 D-Alanina	F6 L-Alanine	F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic Acid	F10 L-Glutamic Acid	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Histidine	G2 Hydroxy-L-Proline	G3 L-Leucine	G4 L-Ornithine	G5 L-Phenylalanine	G6 L-Proline	G7 L-Pyrogutamic Acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	G10 L-Threonine	G11 D,L-Carnitine	G12 γ-Amino Butyric Acid
H1 Urocanic Acid	H2 Inosine	H3 Uridine	H4 Thymidine	H5 Phenylethylamine	H6 Putrescine	H7 2-Aminoethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	H10 D,L-α-Glycerol Phosphate	H11 α-D-Glucose-1-Phosphate	H12 D-Glucose-6-Phosphate

Figura 5. Fuentes de carbono de una microplaca GN2 (para bacterias Gram Negativas).

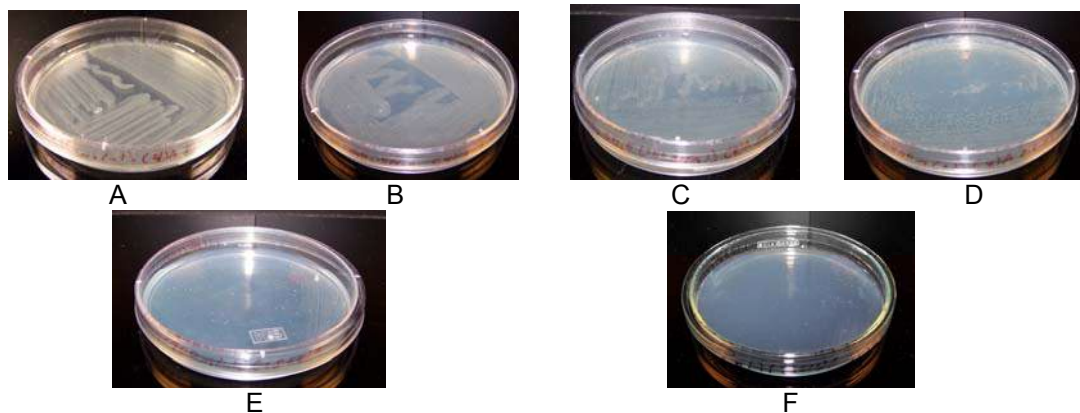
## VII. RESULTADOS

### VII.1 Sensibilidad a metales

Se realizaron ensayos de sensibilidad a metales en medio LBA para saber cuál era la concentración máxima a la cual los distintos aislados de *E. coli* diarreagénica podían crecer.

#### a) Cobre.

Para todos los aislados se puede observar que conforme se fue aumentando la concentración de cobre, el crecimiento de las bacterias fue disminuyendo. En la figura 6 se presenta como ejemplo representativo de las respuestas de todos los aislados estudiados la respuesta del aislado 4 a concentraciones crecientes de cobre.



**Figura 6. Crecimiento de *E. coli* diarreagénica en medio LBA con cobre.**

A (2 mM), B (2.4 mM), C (2.8 mM), D (3.2 mM), E (3.6 mM) F (3.8 mM).

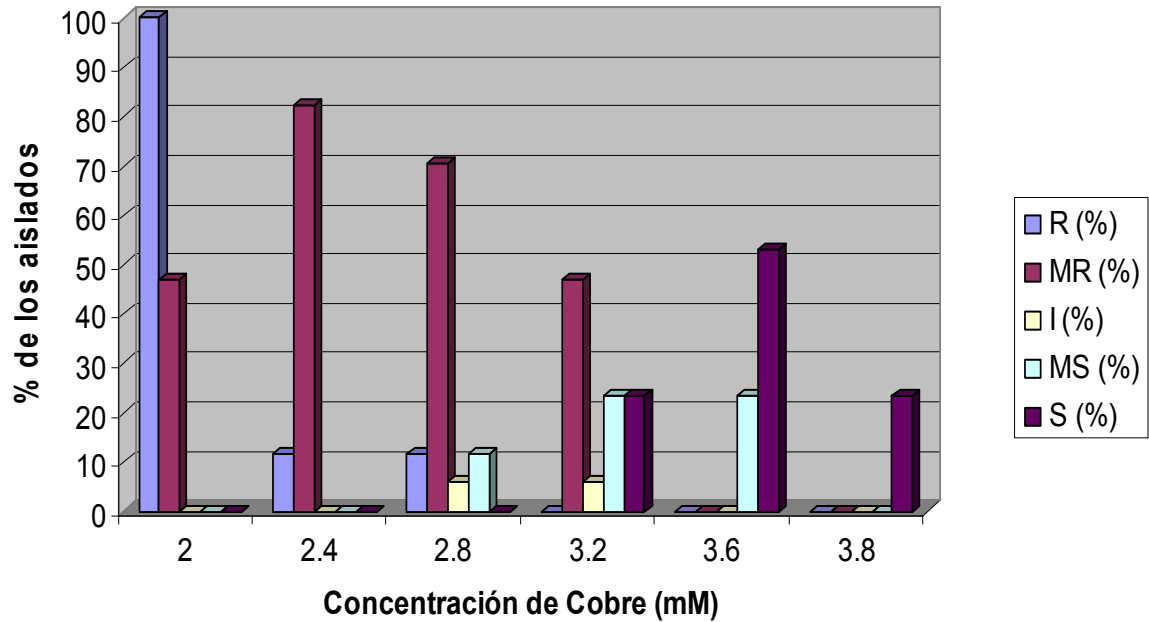
Al probar la sensibilidad a varias concentraciones de cobre de los 13 aislados y de las 4 cuatro cepas de referencia se observó una gran variación en la respuesta (Tabla IV). El aislado más resistente fue el 18, ya que pudo crecer a una concentración de 2.8 mM de cobre, los aislados más sensibles fueron el 6, 14 y 24, ya que tuvieron una menor tolerancia al cobre, deteniendo su crecimiento a una concentración de 3.2 mM.

**TABLA IV. Sensibilidad a cobre de los aislados clínicos de *E. coli* diarregénica.**

AISLADO	Concentración mM					
	2	2.4	2.8	3.2	3.6	3.8
4	R	MR	MR	I	S	S
6	R	MR	MS	S	S	S
10	R	MR	MR	MR	MS	S
13	R	MR	MR	MR	S	S
14	R	MR	MS	S	S	S
18	R	R	R	MR	S	S
20	R	MR	MR	S	S	S
23	R	MR	MR	MS	S	S
24	R	MR	I	S	S	S
53	R	MR	MR	MS	S	S
54	R	MR	MR	MR	S	S
55	R	MR	MR	MS	S	S
57	R	MR	MR	MR	MS	S
ETEC-ST	R	MR	MR	MR	MS	S
ETEC-LT	R	MR	MR	MR	MS	S
EPEC	R	MR	MR	MS	S	S
EIEC	R	R	R	MR	S	S

R = Resistente (++++ = 100% de crecimiento con respecto al control); MR = Moderadamente resistente (+++ = 75%); I = Intermedio (++ = 50%); MS = Moderadamente Sensible (+ = 25%); S = Sensible (- = 0%).

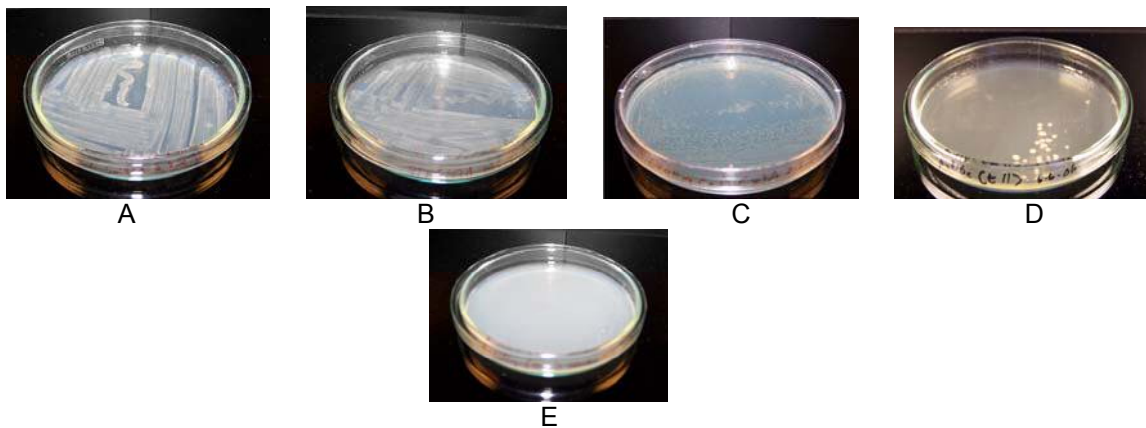
La figura 7 muestra el porcentaje de los aislados que presentaron sensibilidad al cobre en distintas concentraciones. Se puede ver como disminuye el porcentaje de los aislados resistentes conforme aumenta la concentración del metal. El 100% de los aislados fue resistente a 2 mM de cobre, el 82.35% de estos aislados fue moderadamente resistente a una concentración de 2.4 mM, el 5.88% de los aislados fue de resistencia intermedia 2.8 mM, el 23.52% de estos fue moderadamente sensible a 3.2 mM, el 52.95% fue sensible a una concentración de 3.6 mM y el 23.52% de los aislados fue sensible a 3.8 mM.



**Figura 7. Porcentaje de cepas de *E. coli* diarreagénica sensibles a cobre**  
 (R) Resistente; (MR) Moderadamente resistente; (I) Intermedio; (MS) Moderadamente sensible; (S) Sensible.

### b) Plata.

También se estudio la sensibilidad a plata por parte de los aislados estudiados. Como era de esperar, conforme se aumentó la concentración de plata en el medio, el crecimiento de las bacterias fue disminuyendo, como lo muestra el comportamiento del aislado 4 (Fig. 8).



**Figura 8. Crecimiento de *E. coli* diarreagénica en medio LBA con plata.**  
 A (0.025 mM), B (0.05 mM), C (0.1 mM), D (0.15 mM), E (0.2 mM).

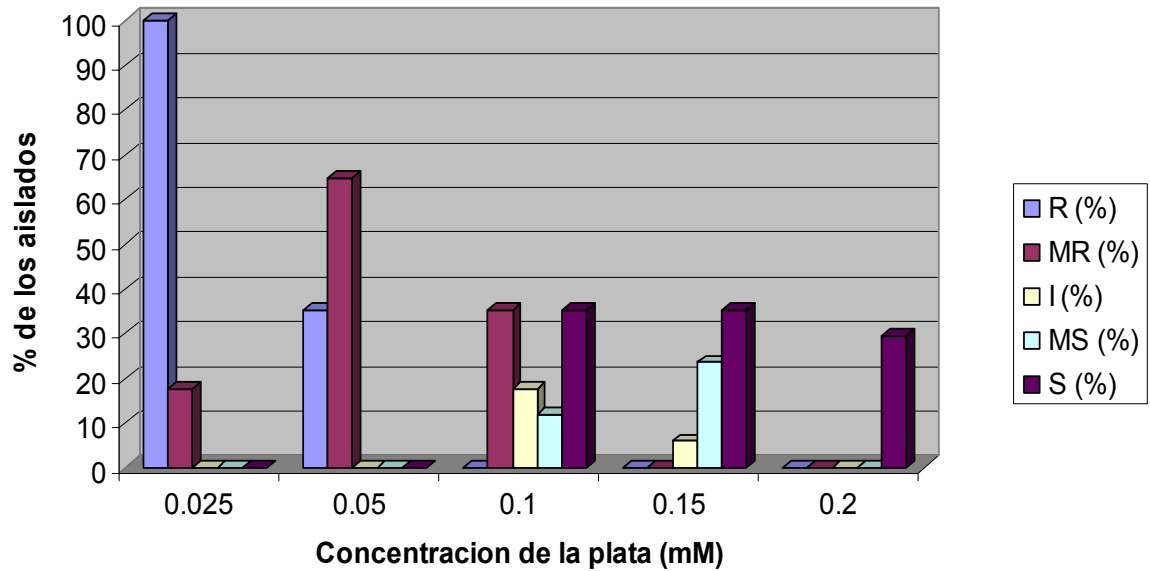
Todos los aislados estudiados fueron capaces de crecer a 0.025 mM de plata y fueron sensibles a 0.2 mM de dicho metal (Tabla V). La cepa ETEC-ST fue la que mostró menor sensibilidad a 0.15 mM de plata, seguida de la cepa EIEC y los aislados 10, 14 y 53. Los aislados que mostraron mayor sensibilidad fueron 6, 13, 20, 23, 24 y la cepa EPEC, los cuales no pudieron crecer a una concentración de 0.1 mM de Ag (Tabla V).

**TABLA V. Sensibilidad a plata de las cepas de *E. coli*.**

AISLADO	Concentración mM				
	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2
4	R	MR	MR	S	S
6	R	MR	S	S	S
10	R	R	MR	MS	S
13	R	MR	S	S	S
14	R	MR	MS	MS	S
18	R	MR	MR	S	S
20	R	MR	S	S	S
23	R	MR	S	S	S
24	R	MR	S	S	S
53	R	R	I	MS	S
54	R	MR	MR	S	S
55	R	R	I	S	S
57	R	R	MR	S	S
ETEC-ST	R	R	MR	I	S
ETEC-LT	R	R	I	S	S
EPEC	R	MR	S	S	S
EIEC	R	MR	MS	MS	S

R = Resistente (++++ = 100%); MR = Moderadamente resistente (+++ = 75%); I = Intermedio (++ = 50%); MS = Moderadamente Sensible (+ = 25%); S = Sensible (- = 0%).

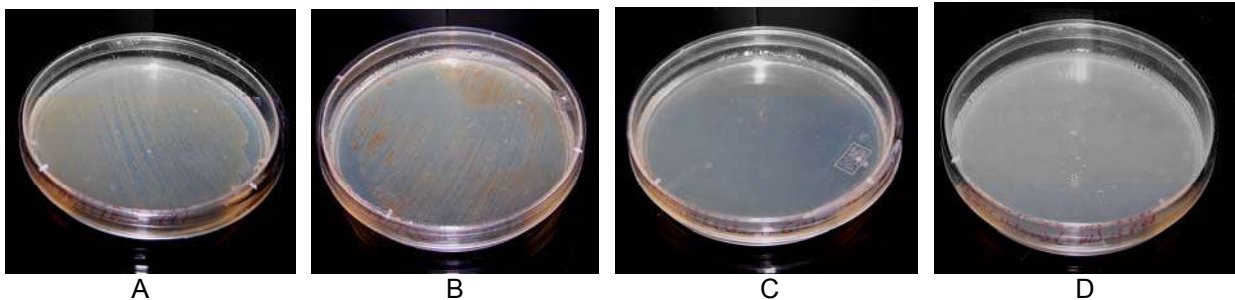
En términos de porcentaje, el 100% de los aislados fue resistente a una concentración de 0.025 mM de plata, el 64.7% de estos fue moderadamente resistente a la concentración de 0.05 mM, el 17.64% de los aislados fue de resistencia intermedia a 0.1 mM, el 23.52% de estos aislados fue moderadamente sensible al metal en una concentración de 0.15 mM y el 29.41% de ellos fue sensible a plata en una concentración de 0.2 mM (Fig. 9)



**Figura 9. Porcentaje de aislados de *E. coli* diarreagénica sensibles a la plata.**  
 (R) Resistente; (MR) Moderadamente resistente; (I) Intermedio; (MS) Moderadamente sensible; (S) Sensible.

### c) Plomo.

Al igual que con los otros metales, el comportamiento de las bacterias en presencia de plomo fue el mismo, ya que conforme se fue aumentando la concentración del metal, el crecimiento disminuyó como muestra el ejemplo del aislado 4 (Fig. 10).



**Figura 10. Crecimiento de *E. coli* diarreagénica en medio LBA con plomo.**

A (1.25 mM), B (2.5 mM), C (5 mM), D (10 mM).

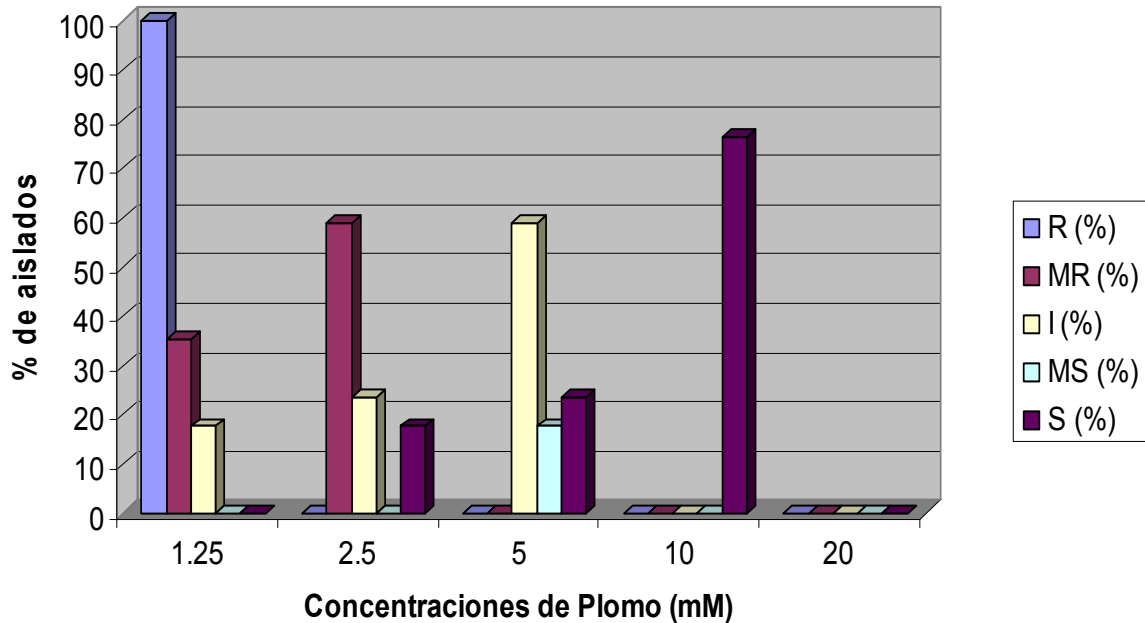
Todos los aislados estudiados mostraron resistencia a 1.24 mM de plomo y sensibilidad a 10 mM (Tabla VI). Los aislados 6, 13 y 24, fueron los más sensibles al metal, inhibiendo significativamente su crecimiento a una concentración de 2.5 mM (Tabla VI).

**TABLA VI. Sensibilidad a plomo de las cepas de *E. coli*.**

AISLADO	Concentración mM			
	1.25	2.5	5	10
4	R	MR	I	S
6	R	S	S	S
10	R	MR	I	S
13	R	S	S	S
14	R	I	S	S
18	R	I	MS	S
20	R	MR	I	S
23	R	MR	I	S
24	R	S	S	S
53	R	MR	I	S
54	R	I	I	S
55	R	MR	I	S
57	R	MR	I	S
<b>ETEC-ST</b>	R	MR	I	S
<b>ETEC-LT</b>	R	MR	I	S
<b>EPEC</b>	R	MR	MS	S
<b>EIEC</b>	R	I	MS	S

R = Resistente (++++ = 100%); MR = Moderadamente resistente (+++ = 75%); I = Intermedio (++ = 50%); MS = Moderadamente Sensible (+ = 25%); S = Sensible (- = 0%).

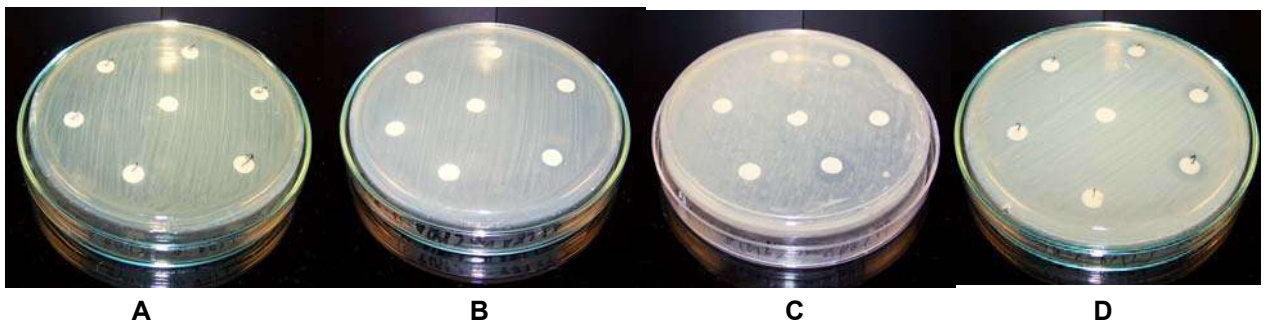
En términos de porcentaje, el 100% de los aislados fue resistente a plomo en una concentración de 1.25 mM, el 58.82% de los aislados fue moderadamente resistente al metal en una concentración de 2.5 mM, pero el 58.82% de ellos fue de resistencia intermedia al metal a una concentración de 5 mM, el 76.47% de los aislados fue sensible a una concentración de 10 mM de plomo (Fig. 11).



**Figura 11. Porcentaje de aislados de *E. coli* diarrreagénica sensibles a plomo**  
 (R) Resistente; (MR) Moderadamente resistente; (I) Intermedio; (MS) Moderadamente sensible; (S) Sensible.

## VII.2 Sensibilidad a Vancomicina.

Se evaluó la sensibilidad a vancomicina de las cepas de estudio y como se puede observar para el caso del aislado 4 (Fig. 12), al aumentar la concentración de este antibiótico en el medio, el crecimiento de las bacterias disminuyó, ya que el halo de inhibición aumentó.



**Figura 12. Crecimiento de *E. coli* diarrreagénica en medio LBA con vancomicina.**  
 A (0.01-0.06  $\mu\text{g}$ ), B (0.02-0.12  $\mu\text{g}$ ), C (0.03-0.18  $\mu\text{g}$ ), D (0.04-0.24  $\mu\text{g}$ ).

Todos los aislados fueron resistentes a 0.08  $\mu\text{g}$  de vancomicina y todos mostraron sensibilidad a 0.24  $\mu\text{g}$  del antibiótico (Tabla VII). De hecho, la gran mayoría de las cepas mostró sensibilidad desde 0.12  $\mu\text{g}$ , excepto las cepas 13 y 23, las cuales las



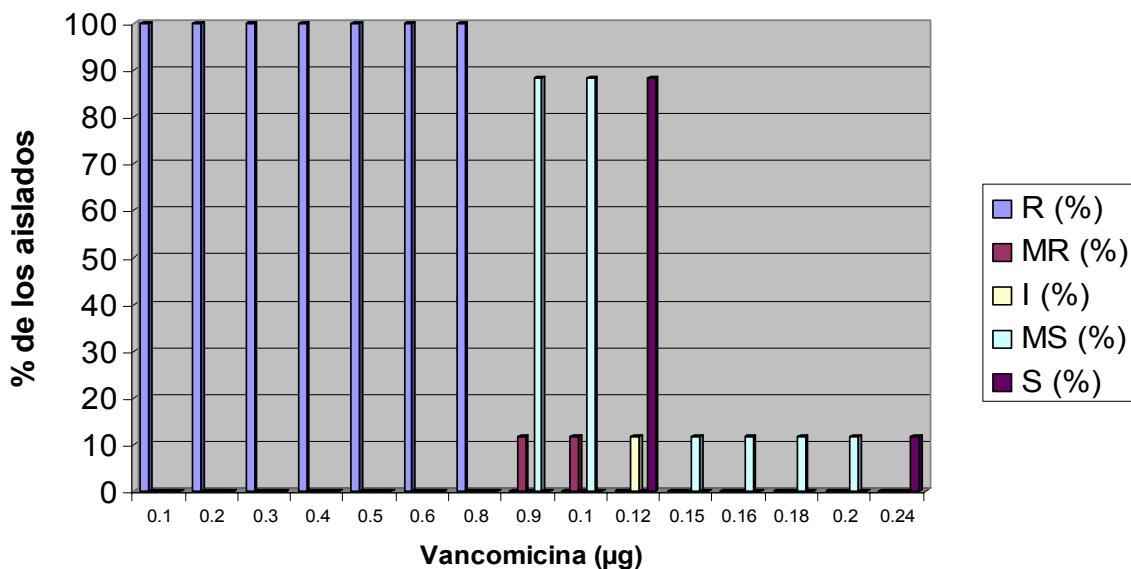
cuales mostraron una sensibilidad intermedia en esta cantidad y moderada entre 0.15 y 0.2 µg (Tabla VII).

**TABLA VII. Sensibilidad a vancomicina de las cepas de *E. coli* diarreagénica.**

Cepas	Vancomicina (µg)														
	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.09	0.1	0.12	0.15	0.16	0.18	0.2	0.24
<b>4</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>6</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>10</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>13</b>	R	R	R	R	R	R	R	MR	MR	I	MS	MS	MS	MS	S
<b>14</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>18</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>20</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>23</b>	R	R	R	R	R	R	R	MR	MR	I	MS	MS	MS	MS	S
<b>24</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>53</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>54</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>55</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>57</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>ETEC-ST</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>ETEC-LT</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>EPEC</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S
<b>EIEC</b>	R	R	R	R	R	R	R	MS	MS	S	S	S	S	S	S

R = Resistente (++++ = 100%); MR = Moderadamente resistente (+++ = 75%); I = Intermedio (++ = 50%); MS = Moderadamente Sensible (+ = 25%); S = Sensible (- = 0%).

El 100% de los aislados fueron resistentes a 0.08 µg de vancomicina, el 5.88% de los aislados fue moderadamente resistentes a 0.09 µg, el 11.76% de los aislados tuvieron una resistencia intermedia a 0.2 µg, el 88.23% de los aislados fue moderadamente sensible a 0.1 µg y el 88.23% de los aislados fue sensible a una 0.12 µg de vancomicina (Fig. 13).



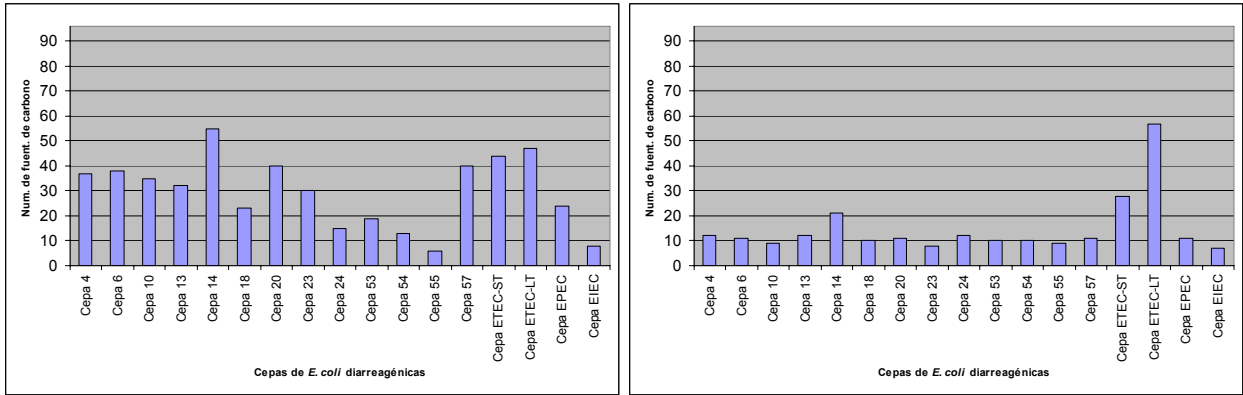
**Figura 13. Porcentaje de aislados de *E. coli* diarreagénica sensibles a vancomicina**  
 (R) Resistente; (MR) Moderadamente resistente; (I) Intermedio; (MS) Moderadamente sensible; (S) Sensible.

### VII.3 Efecto de los metales pesados sobre los niveles de crecimiento y metabolismo de las cepas de *E. coli* diarreagénica.

Se evaluó el efecto de los diferentes metales (cobre, plata y plomo) y de la vancomicina sobre el crecimiento (750nm) y metabolismo (590nm) de las cepas de *E. coli* diarreagénica en presencia de diferentes fuentes de carbono. En estos ensayos se inoculó a cada uno de los aislados en placas GN de Biolog a las cuales se les adicionaron los metales y la vancomicina en concentraciones a las cuales todos los aislados fueron resistentes.

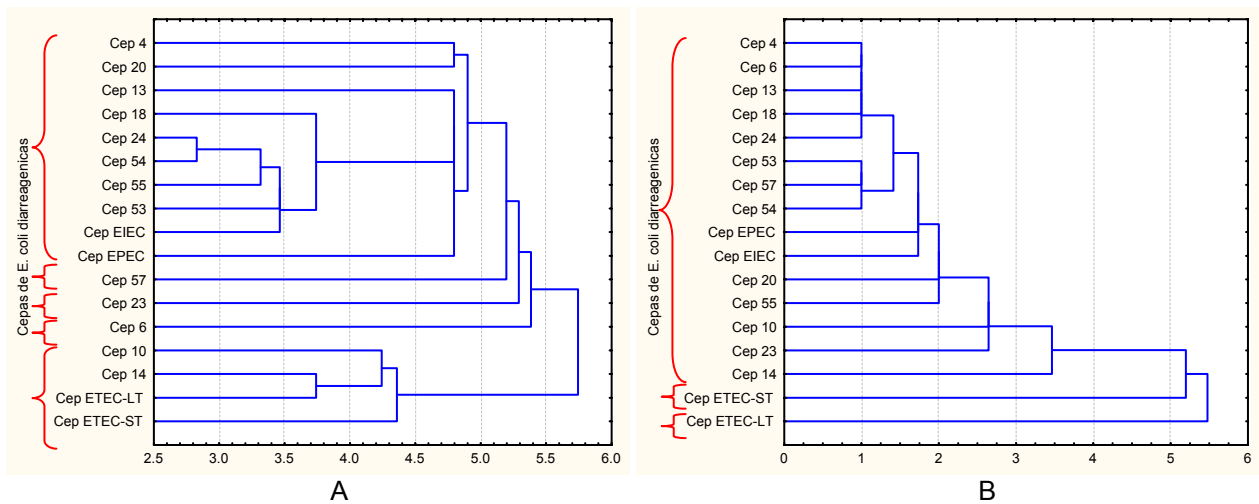
#### a) Cobre.

En presencia de cobre (2 mM) a las 24h de incubación, la cepa que creció en un mayor número de fuentes fue la 14 con un total de 55, seguida de la cepa ETEC-LT con 47 fuentes y en tercer lugar la cepa ETEC-ST con 44 fuentes (Fig. 14 A). En estas condiciones la cepa que creció en menos fuentes fue la 55 con 6 fuentes de carbono (Fig. 14 A). Para el caso de metabolismo, todos los aislados mostraron un comportamiento prácticamente homogéneo. La cepa que más fuentes de carbono metabolizó fue la ETEC-LT con 57 fuentes de carbono, seguida de la cepa ETEC-ST con 28 fuentes de carbono, luego la cepa 14 con 21 fuentes y la cepa que menos fuentes de carbono metabolizó fue la EIEC, con 7 fuentes (Fig. 14 B).



**Figura 14. Efecto del cobre sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en distintas fuentes de carbono.**  
 (A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

Los dendogramas de la figura 15, fueron construidos a partir de los datos de los anexos I y V, en los que se muestran las matrices dicotómicas con los datos de crecimiento y metabolismo de las cepas de *E. coli* diarreagénica. Para el caso del crecimiento, en las fuentes de carbono en presencia de cobre 2 mM a las 24h, se puede observar que se forman 5 grupos. En el grupo mayoritario se encuentran las cepas tipo EIEC y EPEC junto con ocho de los aislados de estudio, mientras que tres de los grupos se encuentran formados por un solo aislado, los cuales son 57, 23 y 6. El último grupo está formado por las cepas 10, 14, ETEC-LT y ETEC-ST (Fig. 15A).

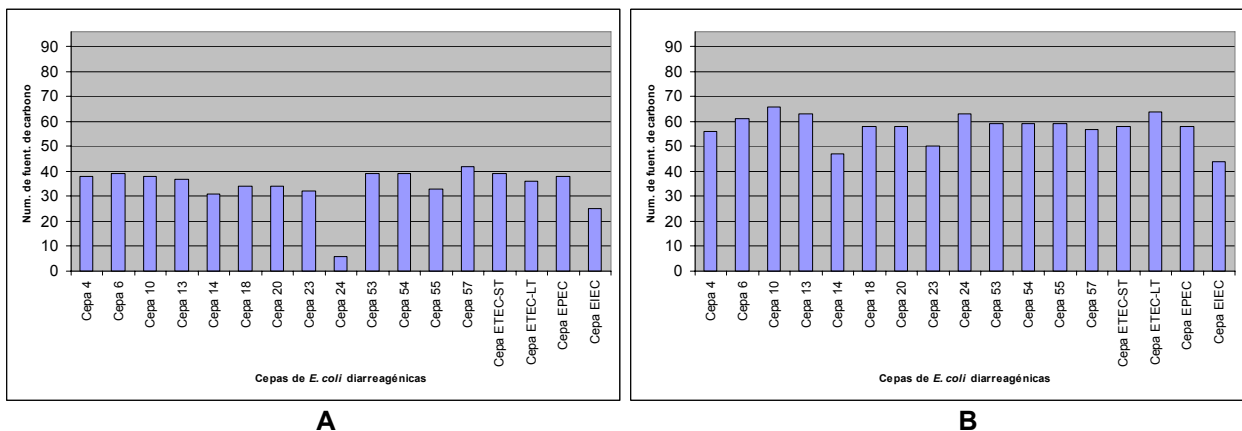


**Figura 15. Análisis de agrupamiento del efecto del cobre sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en las fuentes de carbono.**  
 (A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

Para el caso del metabolismo se forman 3 grupos, el más grande que incluye a todas las cepas de estudio más las cepas de referencia EIEC y EPEC, otro que está formado por ETEC-ST y el otro grupo por la cepa ETEC-LT (Fig. 15 B).

### b) Plata.

El crecimiento de los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica en presencia de plata 0.025 mM fue relativamente homogéneo, creciendo la mayoría de las cepas en más de 35 fuentes de carbono (Fig.16A), excepto por la cepa 24 que solo creció en 6 fuentes de carbono. La cepa que mostró crecimiento en un mayor número de fuentes de carbono fue la 57 con 42 fuentes de carbono, seguida por las cepas 6, 53, 54 y la cepa tipo ETEC-ST todas las cuales crecieron en más de 35 fuentes de carbono (Fig.16 A). La capacidad de las cepas de *E. coli* diarreagénica para metabolizar fuentes de carbono en presencia de plata (0.025 mM) fue muy homogénea, la cepa que más fuentes de carbono metabolizó fue la 10 con 66 fuentes de carbono, seguida por la cepa ETEC-LT con 64 fuentes, luego las cepas 13 y 24 con 63. La cepa que menos fuentes de carbono metabolizó fue la EIEC con 44 fuentes de carbono (Fig.16 B).

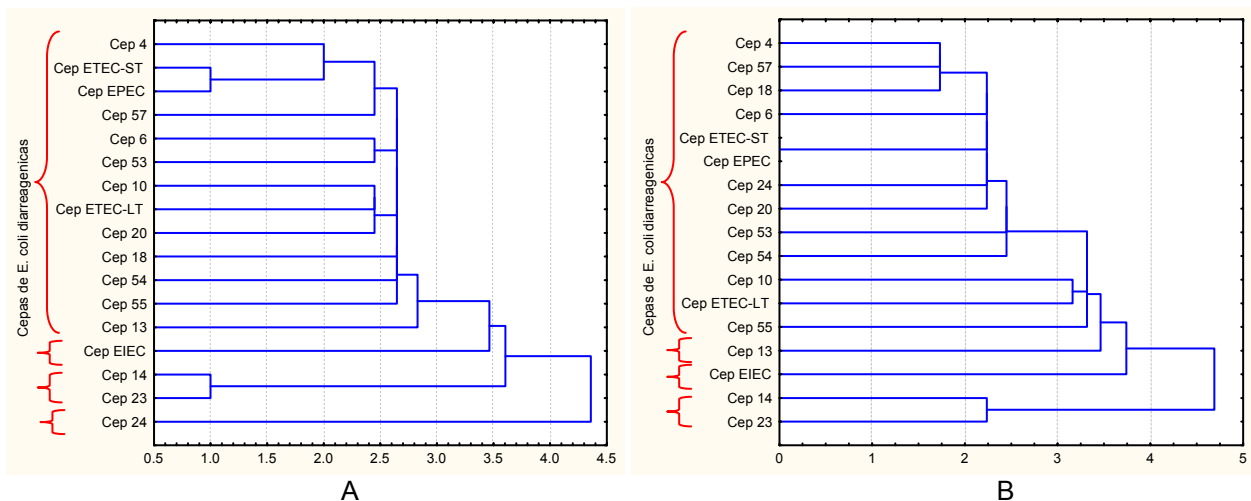


**Figura 16. Efecto de la plata sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en distintas fuentes de carbono.**

(A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

Los dendogramas de la figura 17 fueron construidos a partir de los datos de los anexos II y VI, las cuales contienen la matriz dicotómica con los datos de crecimiento y

metabolismo de los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica. En el caso del crecimiento en presencia de plata a 0.025 mM, podemos observar que se forman 4 grupos (Fig. 17 A). En uno de estos grupos se encuentran la mayoría de las cepas, otro grupo está formado por la cepa EIEC, otro por la cepa 24 y el último grupo lo forman las cepas 14 y 23, estos últimos 3 grupos son las que menos se relacionan con todas las demás cepas (Fig. 17 A). En el caso del metabolismo, se forman 4 grupos, en el más grande se agrupan la mayoría de las cepas, otro grupo está formado por la cepa EIEC, otro por la cepa 24 y el último grupo lo forman las cepas 14 y 23, estos últimos 3 grupos son las que menos se relacionan con todas las demás cepas. Esta agrupación coincide en el número de grupos y la distribución de las cepas con el árbol generado a partir de los datos de crecimiento de los aislados en presencia de plata (Fig. 17 B).

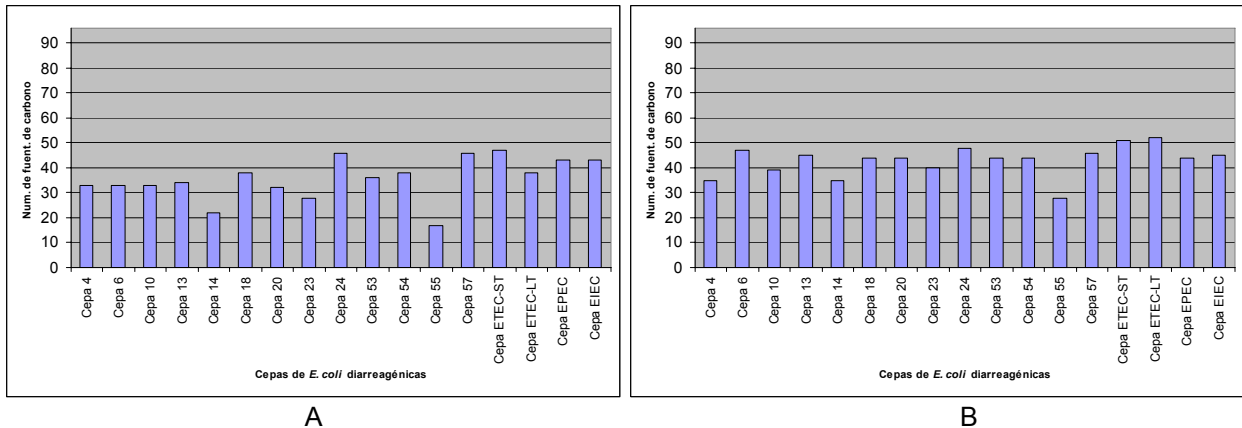


**Figura 17. Análisis de agrupamiento del efecto de la plata sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en las fuentes de carbono.**  
(A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

### c) Plomo.

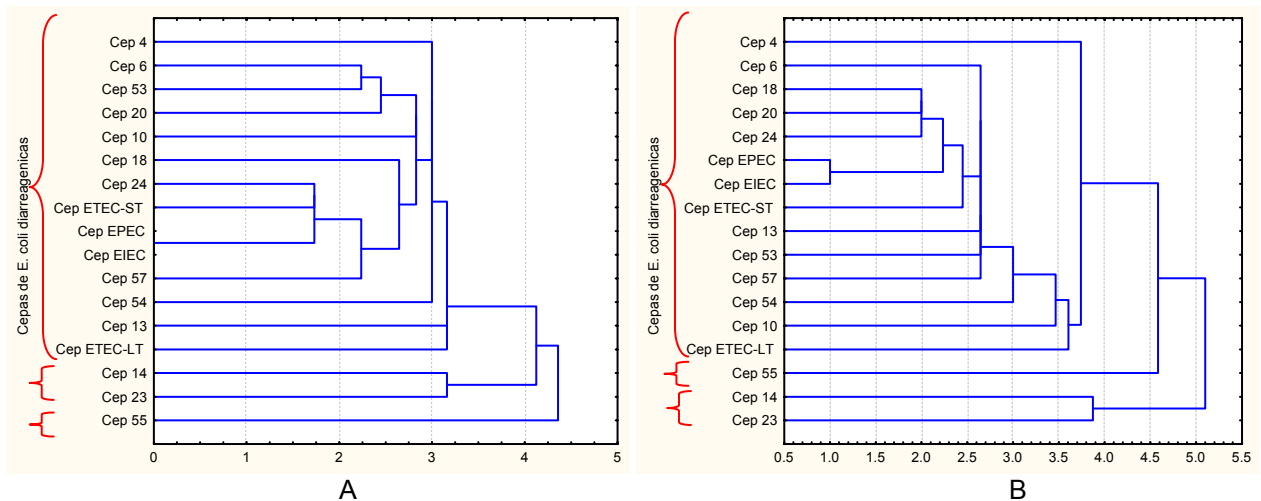
Se obtuvo un crecimiento heterogéneo entre las cepas de estudio en las diferentes fuentes de carbono en presencia de plomo 1.25 mM., La cepa que creció en más fuentes de carbono fue la ETEC-ST con 47 fuentes, seguida por las cepas 24 y 57 con 46 fuentes de carbono, la cepa que creció en menos fuentes de carbono fue la 55 con 17 fuentes (Fig. 18 A). En relación al crecimiento, las cepas mostraron un comportamiento más homogéneo para metabolizar fuentes de carbono en presencia de plomo 1.25 mM, aunque si se observaron

diferencias. Las cepas que más fuentes de carbono metabolizaron fueron la ETEC-LT y la ETEC-ST con 52 y 51 fuentes de carbono, respectivamente, seguidas por la cepa 24 con 48 fuentes; la cepa que menos fuentes de carbono metabolizó fue la 55 con 28 fuentes (Fig. 18 B).



**Figura 18. Efecto del plomo sobre las fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en distintas fuentes de carbono.**  
(A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

Los dendogramas de la figura 19, fueron construidos a partir de los datos de los anexos III y VII, que contienen las matrices dicotómicas con los datos de crecimiento y metabolismo de las cepas de *E. coli* diarreagénica. En el caso del crecimiento en presencia de plomo 1.25 mM, podemos observar que se forman 3 grupos. En el más grande se agrupan la mayoría de las cepas, otro grupo esta formado por la cepa 55 y otro por las cepas 14 y 23, estos últimos 2 grupos son las que menos se relacionan con el resto de las cepas (Fig. 19 A). En el caso del metabolismo presencia de plomo 1.25 mM, los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica, se forman 3 grupos, en el más grande se agrupan la mayoría de las cepas, un grupo está formado por la cepa 55, el otro por las cepas 14 y 23, estos últimos 2 grupos son las que menos se relacionan que con todas las demás cepas. El número de grupos y la distribución de las cepas coinciden con los datos de distribución generados para el caso del crecimiento de los aislados en presencia de plomo (Fig. 19 B).

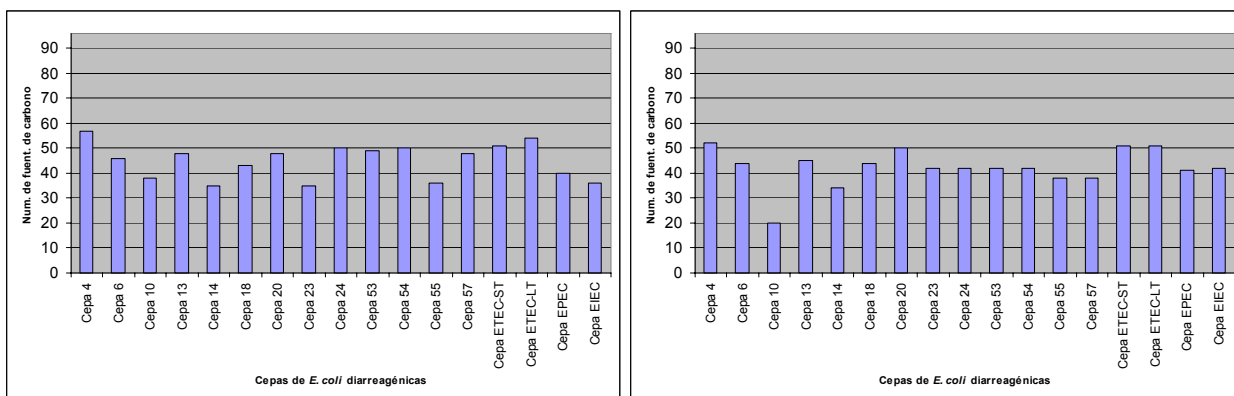


**Figura 19. Análisis de agrupamiento del efecto del plomo sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en las fuentes de carbono.**

(A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

#### VII.4 Efecto de la Vancomicina sobre los niveles de crecimiento y metabolismo de las cepas de *E. coli* diarreagénica.

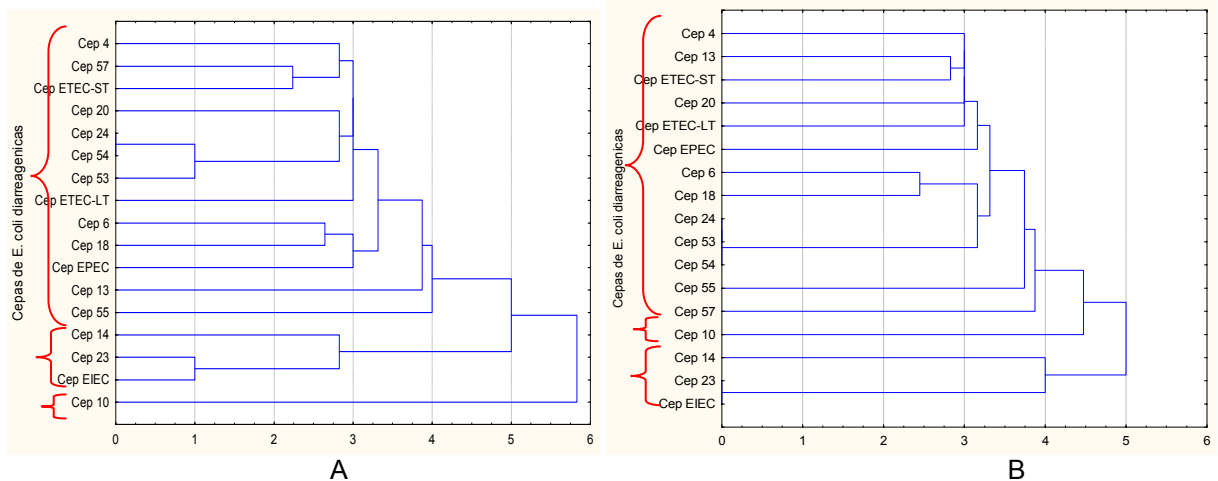
El crecimiento de los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica en distintas fuentes de carbono en presencia de vancomicina 0.08  $\mu\text{g}$ , fue bastante homogéneo. La cepa que creció en más fuentes de carbono fue la 4 con 57 fuentes, seguida por las cepas ETEC-LT con 54 y después la cepa ETEC-ST con 51 fuentes de carbono; la cepa que creció en menos fuentes de carbono fue la 23 con 35 fuentes (Fig. 20 A). Los resultados para metabolismo en presencia de vancomicina también fueron bastante homogéneos, la cepa que más fuentes de carbono metabolizó fue la 4 con 52 fuentes, seguida de las cepas ETEC-ST y ETEC-LT con 51 fuentes de carbono aprovechadas y luego la cepa 20 con 50 fuentes de carbono; la cepa que menos fuentes de carbono metabolizó fue la 10, con 20 fuentes (Fig. 20 B).



**Figura 20. Efecto de la vancomicina sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarregénica en distintas fuentes de carbono.**  
(A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

Los dendogramas de la figura 21, fueron construidos a partir de los datos de los anexos IV y VIII, que contienen las matrices dicotómicas con los datos de crecimiento y metabolismo de las cepas de *E. coli* diarregénica en presencia de vancomicina. En el caso del crecimiento en presencia de vancomicina 0.08 µg, podemos observar que se forman 3 grupos. En el más grande se agrupan la mayoría de las cepas, otro grupo está formado por la cepa 54, el otro grupo está formado por las cepas 14, 23 y EIEC, estos últimos 2 grupos son las que menos se relacionan con el resto de las cepas (Fig. 21 A). Para el metabolismo en presencia de vancomicina (0.08 µg) se forman 3 grupos, el más grande donde están la mayoría de las cepas, otro grupo está formado por las cepas 14, 23 y EIEC, y el otro grupo por la cepa 10, estos últimos 2 grupos son las que menos se relacionan con todas las demás cepas. Existe una estrecha relación con el número de grupos y la distribución de las cepas con los datos de crecimiento de los aislados en presencia de vancomicina (Fig. 21 B).

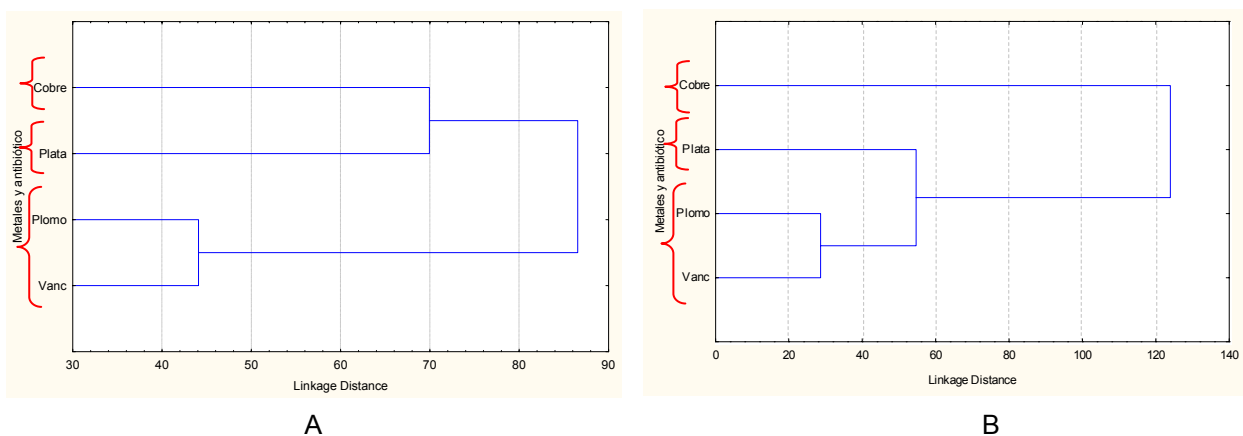




**Figura 21. Análisis de agrupamiento del efecto de la vancomicina sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en las fuentes de carbono.**  
 (A) Crecimiento. (B) Metabolismo.

### VII.5 Análisis de agrupamiento del efecto de los metales (cobre, plata y plomo) y vancomicina, en la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica.

Para determinar si existía alguna relación entre el efecto producido por los metales y el antibiótico sobre la fisiología de las cepas, se construyeron los dendrogramas de la figura 22, a partir de los datos de los anexos I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, que contienen las matrices dicotómicas con los datos de crecimiento y metabolismo de las cepas de *E. coli* diarreagénica. Tanto en el caso del crecimiento como en el caso del metabolismo en presencia de los metales y el antibiótico, podemos observar que se forman 3 grupos, el primero está formado por cobre, el segundo por plata y el tercero por plomo y vancomicina (Fig. 22 A B).



**Figura 22. Análisis de agrupamiento del efecto de los metales (cobre, plata y plomo) y vancomicina, en la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica.**  
 (A) Crecimiento. (B) Metabolismo

## VII.6 Análisis de agrupamiento de las fuente de carbono que fueron utilizadas para el crecimiento y metabolismo de las cepas de *E. coli* diarreagénica en presencia de metales y antibiótico.

Para saber si había una relación entre las fuentes que eran utilizadas por las cepas en presencia de metales y antibiótico, se construyó el dendograma de la figura 23, a partir de los datos de los anexos I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, que contienen las matrices dicotómicas con los datos de crecimiento de las cepas de *E. coli* diarreagénica y se puede observar que se forman 3 grupos de fuentes de carbono (Fig. 23).

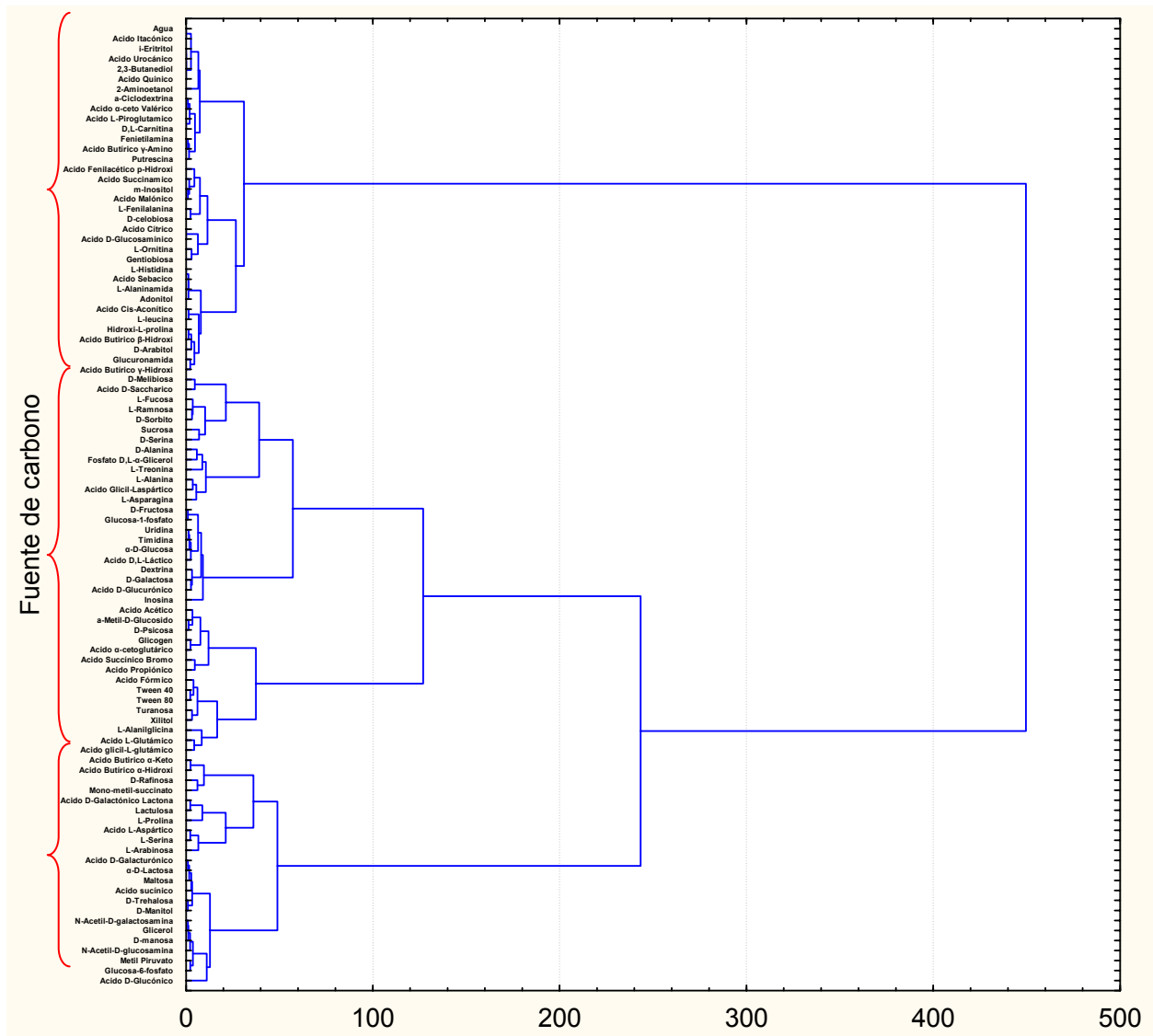


Figura 23. Análisis de agrupamiento de las fuente de carbono en el crecimiento de *E. coli* diarreagénica en presencia de metales y antibiótico.

Para el caso del metabolismo se construyó un dendograma con los datos de los anexos I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, que contiene las matrices dicotómicas con los datos de metabolismo de las cepas de *E. coli* diarregénica, y se puede observar que también se forman 3 grupos de fuentes de carbono, los cuales no coinciden con los grupos formados por el patrón de agrupamiento para crecimiento (Fig. 24).

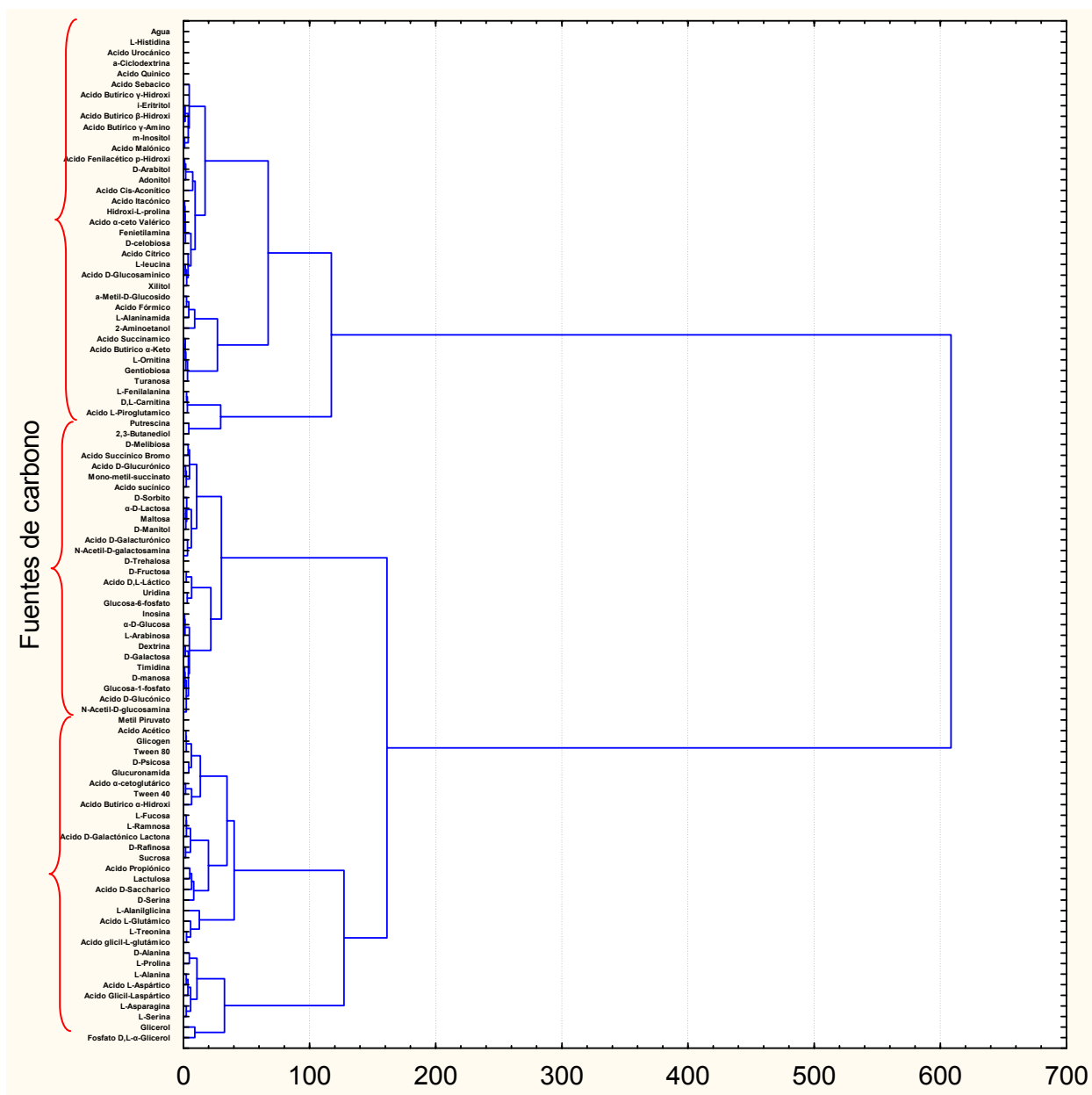


Figura 24. Análisis de agrupamiento del efecto de las fuente de carbono en el metabolismo de *E. coli* diarregénica en presencia de metales y antibiótico.

## VII.7 Análisis de agrupamiento de las fuente de carbono sobre la fisiología de las cepas de *E. coli* diarreagénica en metales y antibiótico.

Para determinar qué fuentes utilizaban preferentemente las cepas de *E. coli* diarreagénica para el crecimiento y metabolismo en presencia de los diferentes compuestos (cobre, plata, plomo o vancomicina) se construyó una tabla VIII con los datos de los anexos I, II, III, IV, V, VI, VII y VIII. Se puede observar que las fuentes se agruparon en mayor, intermedio y menor crecimiento o metabolismo.

**Tabla VIII. Agrupamiento de las fuentes de carbono de acuerdo a su uso por las cepas de *E. coli* diarreagénicas en presencia de los diferentes compuestos.**

**Crecimiento de los aislado de *E. coli* diarreagénica      Metabolismo de los aislado de *E. coli* diarreagénica**

En presencia de cobre	En presencia de plata	En presencia de plomo	En presencia de vancomicina	En presencia de cobre	En presencia de plata	En presencia de plomo	En presencia de vancomicina
Mayor	Mayor	Mayor	Mayor	Mayor	Mayor	Mayor	Mayor
L-Omitina	Acido Acético	D-Melibiosa	Acido Acético	D-Alanina	D-Melibiosa	Agua	D-Melibiosa
D-Alanina	Acido Succínico Bromo	D-Fructosa	Acido Succínico Bromo	L-Alanina	Acido Acético	i-Eritritol	Acido Succínico Bromo
L-Alanina	D-Fructosa	Inosina	D-Fructosa	L-Prolina	Acido Succínico Bromo	D-Melibiosa	D-Fructosa
L-Prolina	Inosina	Dextrina	$\beta$ -Metil-D-Glucósido	L-Alanilglicina	D-Fructosa	Acido Acético	Inosina
L-Alanilglicina	Dextrina	L-Fucosa	Inosina	L-Asparagina	$\beta$ -Metil-D-Glucósido	Acido Fenilacético p-Hidroxi	Dextrina
L-Asparagina	Uridina	Uridina	Dextrina	Acido L-Aspártico	Inosina	Acido Succínico Bromo	L-Fucosa
Acido L-Aspártico	D-Galactosa	D-Galactosa	L-Fucosa	L-Serina	Dextrina	L-Histidina	D-Psicosa
L-Serina	Acido Fórmico	Timidina	D-Psicosa	Acido L-Glutámico	L-Fucosa	Acido Urocánico	Glucuronamida
L-Arabinosa	Timidina	L-Ramnososa	Acido Butírico $\alpha$ -Keto	L-Treonina	D-Psicosa	$\alpha$ -Ciclodextrina	Uridina
Acido L-Glutámico	D-Alanina	Acido D-Galactónico Lactona	Uridina	Acido Glicil-L-Aspártico	Glucuronamida	D-Fructosa	D-Galactosa
L-Treonina	$\alpha$ -D-Glucosa	$\alpha$ -D-Glucosa	Glicogen	Acido glicil-L-glutámico	Uridina	$\beta$ -Metil-D-Glucósido	D-Rafinosa
Acido Glicil-L-Aspártico	Acido D.L-Láctico	D-Sorbito	D-Galactosa	Mediano	Glicogen	Acido Cis-Aconítico	Acido $\alpha$ -cetoglutámico
Acido Butírico $\gamma$ -Hidroxi	L-Alanina	Acido D-Galacturónico	D-Rafinosa	D-Melibiosa	D-Galactosa	Acido Itacónico	Timidina
Acido glicil-L-glutámico	L-Alanilglicina	Acido D.L-Láctico	Acido $\alpha$ -cetoglutámico	D-Fructosa	D-Rafinosa	Acido Succinámico	Tween 40
Mediano	L-Asparagina	N-Acetil-D-galactosamina	Timidina	Inosina	Acido Fórmico	Hidroxi-L-prolina	L-Ramnososa
D-Melibiosa	D-Serina	Sucrosa	L-Ramnososa	Dextrina	L-Alaninamida	Inosina	Acido D-Galactónico Lactona
Acido Acético	Acido D-Glucurónico	Acido D-Glucónico	Acido D-Galactónico Lactona	Timidina	Timidina	Dextrina	D-Alanina
D-Fructosa	Acido L-Glutámico	N-Acetil-D-glucosamina	D-Alanina	Acido D-Galactónico Lactona	Tween 40	L-Fucosa	Tween 80
$\beta$ -Metil-D-Glucosido	Fosfato D,L- $\alpha$ -Glicerol	$\alpha$ -D-Lactosa	$\alpha$ -D-Glucosa	$\alpha$ -D-Glucosa	L-Ramnososa	D-Psicosa	$\alpha$ -D-Glucosa
Dextrina	Acido glicil-L-glutámico	D-Trehalosa	D-Sorbito	D-Sorbito	Acido D-Galactónico Lactona	Acido Cítrico	D-Sorbito
L-Fucosa	Mediano	L-Asparagina	Acido D-Galacturónico	Acido D-Galacturónico	D-Alanina	Acido Butírico $\alpha$ -Keto	Acido D-Galacturónico
Glucuronamida	D-Melibiosa	Acido D-Glucurónico	Acido D,L-Láctico	Acido D,L-Láctico	Tween 80	Glucuronamida	Acido D,L-Láctico
Uridina	$\beta$ -Metil-D-Glucósido	Acido L-Aspártico	L-Alanina	N-Acetil-D-galactosamina	$\alpha$ -D-Glucosa	L-leucina	N-Acetil-D-galactosamina
D-Galactosa	L-Fucosa	Glicerol	N-Acetil-D-galactosamina	Acido D-Glucónico	D-Sorbito	Uridina	Sucrosa
Acido Fórmico	D-Psicosa	L-Arabinosa	Sucrosa	N-Acetil-D-glucosamina	Acido D-Galacturónico	Glicogen	Acido D-Glucónico
L-Alaninamida	Glicogen	Maltosa	Acido D-Glucónico	$\alpha$ -D-Lactosa	Acido D,L-Láctico	D-Galactosa	N-Acetil-D-glucosamina
Timidina	Acido $\alpha$ -cetoglutámico	Acido D-Saccharico	N-Acetil-D-glucosamina	D-Trehalosa	L-Alanina	D-Rafinosa	$\alpha$ -D-Lactosa
Gentiobiosa	Tween 40	D-Manitol	$\alpha$ -D-Lactosa	Acido D-Glucurónico	L-Prolina	Acido Fórmico	D-Trehalosa
L-Ramnososa	L-Ramnososa	Metil Piruvato	D-Trehalosa	Glicerol	N-Acetil-D-galactosamina	Acido $\alpha$ -cetoglutámico	L-Asparagina
Acido D-Galactónico Lactona	Tween 80	Glucosa-1-fosfato	Acido Propiónico	Maltosa	Sucrosa	L-Alaninamida	Acido D-Glucurónico
$\alpha$ -D-Glucosa	D-Sorbito	D-manosa	L-Asparagina	Acido D-Saccharico	Acido D-Glucónico	L-Omitina	Acido L-Aspártico
D-Sorbito	Sucrosa	Acido succínico	Lactulosa	Fosfato D,L- $\alpha$ -Glicerol	L-Alanilglicina	Timidina	L-Serina
Acido D-Galacturónico	Acido Propiónico	Glucosa-6-fosfato	Acido D-Glucurónico	D-Manitol	N-Acetil-D-glucosamina	Tween 40	Glicerol
Acido D,L-Láctico	Turanosa	Mediano	Acido L-Aspártico	Glucosa-1-fosfato	$\alpha$ -D-Lactosa	Gentiobiosa	L-Arabinosa
N-Acetil-D-galactosamina	Xilitol	Acido Succínico Bromo	L-Serina	D-manosa	D-Trehalosa	L-Ramnososa	Maltosa
N-Acetil-D-glucosamina	Acido D-Saccharico	D-Rafinosa	Glicerol	Glucosa-6-fosfato	Acido Propiónico	Acido D-Galactónico Lactona	Fosfato D,L- $\alpha$ -Glicerol
$\alpha$ -D-Lactosa	L-Treonina	D-Alanina	L-Arabinosa	Menor	L-Asparagina	Acido $\alpha$ -ceto Valérico	D-Manitol
D-Trehalosa	Acido Glicil-L-Aspártico	Tween 80	Maltosa	Agua	Lactulosa	D-Alanina	Metil Piruvato
Adonitol	Glucosa-1-fosfato	L-Alanina	Acido Butírico $\alpha$ -	i-Eritritol	Acido D-Glucurónico	L-Fenilalanina	Glucosa-1-fosfato

Lactulosa	Menor	L-Prolina	Hidroxi L-Treonina	Acido Acético	Acido L-Aspártico	Fenietilamina	D-manosa
Acido D-Glucurónico	Agua	2-Aminoetanol	Fosfato D,L- $\alpha$ - Glicerol	Acido Fenilacético p- Hidroxi	L-Serina	Tween 80	Mono-metil-succinato
Glicerol	i-Eritritol	Acido Propiónico	D-Manitol	Acido Succínico Bromo	Glicerol	$\alpha$ -D-Glucosa	Glucosa-6-fosfato
Maltosa	Acido Fenilacético p- Hidroxi	D-Serina	Metil Piruvato	L-Histidina	L-Arabinosa	Mediano	Mediano
Acido D-Saccharico	L-Histidina	Lactulosa	Acido Glicil- Laspártico	Acido Urocánico	Maltosa	Acido Acético	Acido Acético
Fosfato D,L- $\alpha$ -Glicerol	Acido Urocánico	L-Serina	Glucosa-1-fosfato	$\alpha$ -Ciclodextrina	Acido D-Saccharico	D- $\Psi$ cososa	Glicogen
D-Arabitol	$\alpha$ -Ciclodextrina	Fosfato D,L- $\alpha$ - Glicerol	D-manosa	$\beta$ -Metil-D-Glucósido	Acido L-Glutámico	Acido D-Galactónico Lactona	L-Alanina
D-Manitol	Acido Cis-Aconítico	Acido Glicil- Laspártico	Mono-metil-succinato	Acido Cis-Aconítico	L-Treonina	Tween 80	L-Prolina
Metil Piruvato	Acido Itacónico	Mono-metil-succinato	Acido succínico	Acido Itacónico	Fosfato D,L- $\alpha$ - Glicerol	D-Serina	D-Serina
Glucosa-1-fosfato	Acido Succinámico	Menor	Glucosa-6-fosfato	Acido Succinámico	D-Manitol	Lactulosa	Acido Butírico $\alpha$ - Hidroxi
D-manosa	Hidroxi-L-prolina	Agua	Mediano	Hidroxi-L-prolina	Metil Piruvato	Menor	L-Treonina
Mono-metil-succinato	Acido Cítrico	i-Eritritol	Acido Fenilacético p- Hidroxi	L-Fucosa	Acido Glicil- Laspártico	Agua	Acido Glicil- Laspártico
Acido succínico	Acido Butírico $\alpha$ -Keto	Acido Acético	Menor	D- $\Psi$ cososa	Glucosa-1-fosfato	i-Eritritol	Acido succínico
Glucosa-6-fosfato	Glucuronamida	Acido Fenilacético p- Hidroxi	Agua	Acido Cítrico	D-manosa	Acido Fenilacético p- Hidroxi	Acido glicil-L- glutámico
Menor	L-leucina	L-Histidina	i-Eritritol	Acido Butírico $\alpha$ -Keto	Mono-metil-succinato	L-Histidina	Menor
Agua	D-Rafinosa	Acido Urocánico	D-Melibiosa	Glucuronamida	Acido succínico	Acido Urocánico	Agua
i-Eritritol	L-Alaninamida	$\alpha$ -Ciclodextrina	L-Histidina	L-leucina	Acido glicil-L- glutámico	$\alpha$ -Ciclodextrina	i-Eritritol
Acido Fenilacético p- Hidroxi	L-Ornitina	$\beta$ -Metil-D-Glucósido	Acido Urocánico	Uridina	Glucosa-6-fosfato	$\beta$ -Metil-D-Glucósido	Acido Fenilacético p- Hidroxi
Acido Succínico Bromo	Gentobiosa	Acido Cis-Aconítico	$\alpha$ -Ciclodextrina	Glicogen	Mediano	Acido Cis-Aconítico	L-Histidina
L-Histidina	Acido D-Galactónico Lactona	Acido Itacónico	Acido Cis-Aconítico	D-Galactosa	Acido Succinámico	Acido Itacónico	Acido Urocánico
Acido Urocánico	Acido $\alpha$ -ceto Valérico	Acido Succinámico	Acido Itacónico	D-Rafinosa	Acido Butírico $\alpha$ -Keto	Acido Succinámico	$\alpha$ -Ciclodextrina
$\alpha$ -Ciclodextrina	L-Fenilalanina	Hidroxi-L-prolina	Acido Succinámico	Acido Fórmico	Acido $\beta$ -cetoglutámico	Hidroxi-L-prolina	$\beta$ -Metil-D-Glucósido
Acido Cis-Aconítico	Fenietilamina	D- $\Psi$ cososa	Hidroxi-L-prolina	Acido $\alpha$ -cetoglutámico	L-Ornitina	Acido Cítrico	Acido Cis-Aconítico
Acido Itacónico	Acido D- Galacturónico	Acido Cítrico	Acido Cítrico	L-Alaninamida	Gentobiosa	Acido Butírico $\alpha$ -Keto	Acido Itacónico
Acido Succinámico	L-Prolina	Acido Butírico $\alpha$ -Keto	Glucuronamida	L-Ornitina	2-Aminoetanol	Glucuronamida	Acido Succinámico
Hidroxi-L-prolina	Putrescina	Glucuronamida	L-leucina	Tween 40	D-Serina	L-leucina	Hidroxi-L-prolina
Inosina	N-Acetil-D- galactosamina	L-leucina	Acido Fórmico	Gentobiosa	Turanosa	Glicogen	Acido Cítrico
D- $\Psi$ cososa	m-Inositol	Glicogen	L-Alaninamida	L-Ramnosa	Acido Butírico $\alpha$ - Hidroxi	Acido Fórmico	Acido Butírico $\alpha$ -Keto
Acido Cítrico	Acido D-Glucónico	Acido Fórmico	L-Ornitina	Acido $\alpha$ -ceto Valérico	Menor	Acido $\alpha$ -cetoglutámico	L-leucina
Acido Butírico $\alpha$ -Keto	Acido Malónico	Acido $\alpha$ -cetoglutámico	Tween 40	L-Fenilalanina	Agua	L-Alaninamida	Acido Fórmico
L-leucina	Acido L- Piroglutámico	L-Alaninamida	Gentobiosa	Fenietilamina	i-Eritritol	L-Ornitina	L-Alaninamida
Glicogen	2-Aminoetanol	L-Ornitina	Acido $\alpha$ -ceto Valérico	Tween 80	Acido Fenilacético p- Hidroxi	Tween 40	L-Ornitina
D-Rafinosa	N-Acetil-D- glucosamina	Tween 40	L-Fenilalanina	Putrescina	L-Histidina	Gentobiosa	Gentobiosa
Acido $\alpha$ -cetoglutámico	$\alpha$ -D-Lactosa	Gentobiosa	Fenietilamina	m-Inositol	Acido Urocánico	Acido $\alpha$ -ceto Valérico	Acido $\alpha$ -ceto Valérico
Tween 40	D-Trehalosa	Acido $\alpha$ -ceto Valérico	Tween 80	Sucrosa	$\alpha$ -Ciclodextrina	L-Fenilalanina	L-Fenilalanina
Acido $\alpha$ -ceto Valérico	Acido D- Glucosaminico	L-Fenilalanina	L-Prolina	Acido Malónico	Acido Cis-Aconítico	Fenietilamina	Fenietilamina
L-Fenilalanina	2,3-Butanediol	Fenietilamina	Putrescina	Acido L- Piroglutámico	Acido Itacónico	Putrescina	Putrescina
Fenietilamina	Adonitol	Putrescina	m-Inositol	2-Aminoetanol	Hidroxi-L-prolina	m-Inositol	m-Inositol
Tween 80	Lactulosa	m-Inositol	Acido Malónico	Acido D- Glucosaminico	Acido Cítrico	Acido Malónico	Acido Malónico
Putrescina	Acido Quínico	Acido Malónico	L-Alanilglicina	Acido Propiónico	L-leucina	L-Alanilglicina	L-Alanilglicina
m-Inositol	Acido L-Aspártico	L-Alanilglicina	Acido L- Piroglutámico	D-Serina	Acido $\alpha$ -ceto Valérico	Acido L- Piroglutámico	Acido L- Piroglutámico
Sucrosa	L-Serina	Acido L- Piroglutámico	2-Aminoetanol	2,3-Butanediol	L-Fenilalanina	2-Aminoetanol	2-Aminoetanol
Acido D-Glucónico	Glicerol	Acido D- Glucosaminico	Acido D- Glucosaminico	Adonitol	Fenietilamina	Acido D- Glucosaminico	Acido D- Glucosaminico
Acido Malónico	L-Arabinosa	2,3-Butanediol	D-Serina	Lactulosa	Putrescina	2,3-Butanediol	Acido Propiónico
Acido L-Piroglutámico	Maltosa	Adonitol	2,3-Butanediol	Turanosa	m-Inositol	Adonitol	2,3-Butanediol
2-Aminoetanol	Acido Butírico $\alpha$ - Hidroxi	Turanosa	Adonitol	Acido Quínico	Acido Malónico	Turanosa	Adonitol
Acido D-Glucosaminico	D-Arabitol	Acido Quínico	Turanosa	L-Arabinosa	Acido L- Piroglutámico	Acido Quínico	Lactulosa
Acido Propiónico	D-Manitol	Xilitol	Acido Quínico	Xilitol	Acido D- Glucosaminico	Xilitol	Turanosa
D-Serina	Metil Piruvato	Acido Butírico $\alpha$ - Hidroxi	Xilitol	Acido Butírico $\alpha$ - Hidroxi	2,3-Butanediol	Acido Butírico $\alpha$ - Hidroxi	Acido Quínico
2,3-Butanediol	Acido Butírico $\beta$ - Hidroxi	Acido L-Glutámico	Acido D-Saccharico	D-Arabitol	Adonitol	Acido L-Glutámico	Xilitol
Turanosa	Acido Sebacoico	L-Treonina	Acido L-Glutámico	Metil Piruvato	Acido Quínico	L-Treonina	Acido D-Saccharico
Acido Quínico	D,L-Carnitina	D-Arabitol	D-Arabitol	Acido Butírico $\beta$ - Hidroxi	Xilitol	D-Arabitol	Acido L-Glutámico
Xilitol	D-celobiosa	Acido Butírico $\beta$ - Hidroxi	Acido Butírico $\beta$ - Hidroxi	Acido Sebacoico	D-Arabitol	Acido Butírico $\beta$ - Hidroxi	D-Arabitol
Acido Butírico $\alpha$ -Hidroxi	D-manosa	Acido Sebacoico	Acido Sebacoico	D,L-Carnitina	Acido Butírico $\beta$ - Hidroxi	Acido Sebacoico	Acido Butírico $\beta$ - Hidroxi
Acido Butírico $\beta$ -Hidroxi	Mono-metil-succinato	D,L-Carnitina	D,L-Carnitina	D-celobiosa	Acido Sebacoico	D,L-Carnitina	Acido Sebacoico
Acido Sebacoico	Acido Butírico $\gamma$ - Hidroxi	D-celobiosa	D-celobiosa	Mono-metil-succinato	D,L-Carnitina	D-celobiosa	D,L-Carnitina
D,L-Carnitina	Acido succínico	Acido Butírico $\gamma$ - Hidroxi	Acido Butírico $\gamma$ - Hidroxi	Acido Butírico $\gamma$ - Hidroxi	D-celobiosa	Acido Butírico $\gamma$ - Hidroxi	D-celobiosa
D-celobiosa	Acido Butírico $\gamma$ - Amino	Acido glicil-L- glutámico	Acido glicil-L- glutámico	Acido succínico	Acido Butírico $\gamma$ - Hidroxi	Acido glicil-L- glutámico	Acido Butírico $\gamma$ - Hidroxi
Acido Butírico $\gamma$ -Amino	Glucosa-6-fosfato	Acido Butírico $\gamma$ - Amino	Acido Butírico $\gamma$ - Amino	Acido Butírico $\gamma$ - Amino	Acido Butírico $\gamma$ - Amino	Acido Butírico $\gamma$ - Amino	Acido Butírico $\gamma$ - Amino

## VIII. DISCUSION.

Las bacterias han desarrollado para poder sobrevivir entre otras capacidades, la resistencia a los antibióticos y a metales tóxicos (Simon and Phung, 2005). Los trabajos a este respecto han sido realizados en su mayoría en bacterias de distintas especies pero no en aislados de una misma especie y patotipo. En este trabajo, se realizaron ensayos de sensibilidad a diferentes metales (cobre, plata y plomo) y a vancomicina en cepas de *E. coli* enterotoxigénica. En relación con los metales, se observó en general que conforme aumentó la concentración del cobre, plata y plomo, la sensibilidad de las bacterias aumentó. El 100 % de los aislados fue sensible a 0.2 mM de plata (Tabla V), 3.8 mM de cobre (Tabla IV) y 10 mM de plomo (Tabla VI). Este orden de toxicidad coincide con lo reportado en bacterias no patógenas de *E. coli*, (Mojica-Hernández, 2006) y en bacterias de distintos géneros (Cha y Cooksey, 1991).

Las cepas de *E. coli* estudiadas en este trabajo fueron más sensibles a cobre y menos sensibles a plata y plomo que las no patógenas estudiadas por Mojica-Hernández (2006), pero coinciden con un estudio en donde miden la concentración mínima inhibitoria de 31 metales tóxicos en *E. coli* (Spain, 2003). La diferencia en los niveles de sensibilidad entre nuestro estudio y el reporte previo de Mojica-Hernández (2006), puede deberse a que en nuestro trabajo, los aislados fueron obtenidos de pacientes que acudieron a diferentes centros de salud y que por lo tanto tienen distintos hábitos alimenticios y viven en distintos lugares. En ese sentido se puede mencionar que se ha observado una relación entre el hábitat de procedencia y las características fisiológicas de cepas bacterianas, como ha sido reportado para aislados ambientales de bacterias enteropatógenas y *E. coli* enterotoxigénica, los cuales mostraron una alta sensibilidad a plata, cobre y al plomo debido al ambiente salino de las costas en donde fueron colectadas (Choudhury y Kumar, 1996).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para las cepas diarreagénicas de nuestro estudio fueron, para la plata 0.05 mM, para el cobre 2.4 mM y para el plomo 2.5 mM en comparación con las cepas de *E. coli* no patógenas fueron diferentes (Mojica-Hernández, 2006). También hay diferencias con otras cepas de *E. coli* (Spain, 2003; Silver S, 2005) en donde las CMI fueron las siguientes, para plata 0.2 mM, cobre 1 mM y para plomo 5 mM. La resistencia encontrada en las cepas de *E. coli* enterotoxigénica

a los metales pesados estudiados (cobre, plata y plomo) es importante, ya que un alto porcentaje de las bacterias que son resistentes a metales pesados son también resistentes a los antibióticos (Calomiris y col., 1984), y esta resistencia está mediada por la transmisión de plásmidos entre poblaciones de coliformes.

La resistencia múltiple a antibióticos así como su asociación con la resistencia a metales ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) se ha reportado en bacterias que habitan tanto en la tierra como en el agua (Lazar y col., 2002). El contacto con los metales puede ser de distinta índole, algunos de esos metales han sido usados en comida para animales como promotores de crecimiento y terapia (Harnett y Gyles, 1984; Cha y Cooksey, 1991) o bien se encuentran en aguas residuales provocando resistencia cruzada a metales y antibióticos, como se ha reportado para *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus* sp. (Filali y col., 2000). Dicho comportamiento también se ha reportado para aislados de *E. coli*, en Brasil (Cardona y col., 2004).

La sensibilidad a vancomicina de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica fue alta, lo cual resulta interesante ya que la vancomicina, es un antibiótico glicopéptido usado en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones causadas por las bacterias Gram-positivas (Hardman y Limbird, 2005) y no para Gram- negativas como *E. coli*, sin embargo ya se ha reportado la sensibilidad de *E. coli* a dicho antibiótico tanto en la microflora intestinal de cuervos (Yoko y col., 2004) como en distintos aislados vaginales (Tariq y col., 2006), Nuestros resultados sugieren la presencia de algún mecanismo de transferencia genética que las hizo sensibles a este antibiótico.

Cada una de nuestras cepas mostró un grado distinto de sensibilidad a vancomicina, aunque las cepas más resistentes fueron la 13 y 23 (Tabla VII). Este comportamiento puede deberse a que hay varios factores que influyen en la entrada de la vancomicina por la membrana externa de las bacterias Gram-negativas ya que los peptidoglucanos están por debajo de esta membrana externa y es donde este antibiótico tiene su punto de acción, sirviéndole como una barrera de infiltración selectiva, las moléculas de liposacáridos de esta barrera excluyen a los componentes hidrofílicos grandes e hidrofóbicos (Hirvas y col., 1997). Cerca de la mitad de la membrana externa de las bacterias Gram + está formada por proteínas que también existen en la membrana

plasmática de las bacterias Gram-negativas (Nikaido and Vaara, 1985), estas proteínas están involucradas en el transporte, detoxificación, procesos catabólicos y anabólicos (Tam y Saier, 1993) y están relacionados con la sensibilidad a vancomicina como se ha mostrado en mutantes de *E. coli* que carecen de hidrolasas de mureina (Korsak y col., 2005), o que poseen una mutación en las porinas de la membrana (Nikaido, 2003). Mutaciones en la ligasa Ddl, (Park y col., 1996) o en la proteína TraT (Sy y col., 1991) de *E. coli* también le confieren susceptibilidad a vancomicina.

En cuanto a la relación entre la sensibilidad a vancomicina y la resistencia a cobre, plata y plomo, no hay ningún estudio con *E. coli* diarreagénica, pero sí con aislados de *Staphylococcus* spp., en los que la relación que se ha encontrado es la resistencia cruzada entre el cromo, el plomo y la penicilina-G, ya que ninguna cepa fue resistente a vancomicina además de la presencia de plásmidos de resistencia a metales pesados y antibióticos (Ug y Ceylan, 2003).

En el presente estudio se evaluó también el efecto de los diferentes metales (cobre, plata y plomo) y de vancomicina sobre el crecimiento (lectura a una longitud de onda de 750 nm) y metabolismo (lectura a una longitud de onda de 590 nm) en diferentes fuentes de carbono, de las cepas de *E. coli* diarreagénica. Se probaron para todos los metales concentraciones a las cuáles todas las cepas tuvieran el mismo crecimiento para generar resultados debidos a la interacción metal-fuente de carbono y no debidos a la inhibición por concentración tóxica del metal.

En presencia de Cu 2 mM (Tabla IV) el crecimiento de todas las cepas fue heterogéneo (Fig. 14 A), mostrando una diversidad fisiológica en respuesta al metal. Por otro lado, el metabolismo de las distintas cepas fue casi homogéneo (Fig. 14 B), lo cual indica que las cepas están utilizando algún componente de reserva para el crecimiento. En presencia de este metal, las cepas crecieron en 8 a 25 fuentes de carbono y metabolizaron entre 8 a 11 fuentes siendo la condición en que las cepas crecieron y metabolizaron menor número de fuentes. Estos resultados mostraron que el cobre es el metal que afecta más la fisiología de los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica, en comparación con la plata y el plomo. La razón de este comportamiento puede deberse a que el Cu en bajas concentraciones es necesario para las funciones enzimáticas (metabolismo) y el crecimiento bacteriano (Cañizares, 2000). El cobre es un elemento traza esencial



para muchos organismos, que es utilizado como parte de un grupo prostético de enzimas de oxidación, el cual representa una parte importante en los procesos vitales de reducción y oxidación, pero el exceso de cobre es tóxico, especialmente para los microorganismos (Cha y Cooksey, 1991).

Para el caso de la plata 0.025 mM, concentración a la que todas las cepas de *E. coli* diarreagénica fueron resistentes (Tabla V), se obtuvo tanto un crecimiento como un metabolismo más homogéneo de todas las cepas en las distintas fuentes de carbono (Fig. 15 A), en comparación con el cobre. En presencia de plata, las cepas crecieron en 30 a 40 fuentes de carbono, y metabolizaron entre 50 a 60 fuentes mostrando que la plata es la que menos influye en el metabolismo de los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica, en comparación con el cobre y plomo en los que ninguna o muy pocas de las fuentes probadas son metabolizadas para crecer.

El efecto que los diferentes factores de estrés tuvieron sobre la fisiología de las cepas, tomando en cuenta el número de fuentes utilizadas fue el siguiente: para el caso del crecimiento Cu>Pb>Ag>Vanc, y para el caso del metabolismo fue Cu>Pb>Vanc>Ag.

Al hacer el análisis de agrupamiento para determinar la relación entre el efecto de los tres metales y la vancomicina sobre la fisiología de las cepas, se obtuvo que para el crecimiento se forman dos grupos (Fig. 22 A), el primero está constituido por el cobre y la plata y el segundo por el plomo y la vancomicina. Para el caso del metabolismo, se forman los mismos grupos e incluso lo conforman los mismos miembros (Fig. 22 B). Esto podría sugerir que los aislados de *E. coli* diarreagénica comparten los mismos mecanismos de resistencia para el cobre y la plata y otros mecanismos que pudieran ser compartidos para la resistencia del plomo y de vancomicina que podría ser por medio de expulsión de los metales y el antibiótico por bombas.

Al evaluar el nivel de crecimiento y metabolismo de los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica en presencia de los diferentes compuestos (cobre, plata, plomo o vancomicina) en las distintas fuentes, se hicieron tres grupos (mayor, intermedio y menor crecimiento o metabolismo) de los aislados clínicos de *E. coli* diarreagénica. Se encontró que la fuente que estuvo involucrada en el crecimiento de las cepas en presencia de estos compuestos fue L- asparagina y para el caso del metabolismo las fuentes que estuvieron involucradas fueron las siguientes: D- alanina, L- asparagina, L-

ácido aspártico y L- serina y la fuente de carbono que estuvo involucrada tanto en el crecimiento como en el metabolismo de los aislados de *E. coli* diarreagénica en presencia de cobre plata plomo y vancomicina a las 24 h fue la L- asparagina. Lo cual sugiere que las fuentes de carbono indispensables tanto para el crecimiento como el metabolismo de las cepas de *E. coli* diarreagénica en dichas condiciones, son los aminoácidos, en contraposición con lo encontrado con cepas de *E. coli* de intestino de ratón (Chang y col., 2004) usando microplacas de 96 fuentes de carbono (FLUOstar Optima). Dicho estudio reveló que los azúcares eran los nutrientes preferentemente utilizados por las cepas estudiadas aunque dependientes de las lesiones en el intestino. Sin embargo, en cepas de colección de *Salmonella typhimurium* se encontró una diversidad en cuanto a la utilización de fuentes para su metabolismo (Taracy y col., 2002), siendo el orden de utilización de fuentes de carbono: D-celobiosa > 2-Aminoetanol > D-treonina > ácido acetoacético = feniletilamina > ácido glicólico = ácido D-malico = lactulosa = ácido-γ-lactona = L-galactónico. El orden de preferencia en metabolismo de las fuentes de nitrógeno fue: Ala-Asp > putrescina > Ácido L-glutámico > L-homoserina > agmatina > etilenediamina > ácido D-glutámico = hiroxilamina = guanina = ácido úrico = ácido D, L-α Amino-Caprílico.

Por todo lo anterior podemos ver que en nuestro estudio hay una gran diversidad en el comportamiento de las cepas estudiadas para crecer y metabolizar en las diferentes fuentes y en presencia de los diferentes compuestos.

## IX. CONCLUSIONES.

Los aislados clínicos de *E. coli* enterotoxigénica mostraron mayor sensibilidad a Ag y menor sensibilidad a Pb (Toxicidad: Pb < Cu < Ag).

La concentración de vancomicina a la cual se inhibió el crecimiento del 100% de los aislados fue de  $53.85 \times 10^{-6}$  mM, la cual es una concentración muy baja. Los aislados 13 y 23 fueron los más resistentes.

El Cu fue el metal que presentó mayor efecto sobre el crecimiento y el metabolismo de los aislados de *E. coli* estudiados.

Tanto el Pb como la vancomicina fueron los agentes que menor efecto presentaron sobre el crecimiento y metabolismo de *E. coli*. Lo cual es evidente en el análisis cluster.

El Cu fue el metal que mayor inhibición metabólica provocó en los aislados de *E. coli* estudiados.

Las fuentes de carbono indispensables tanto para el crecimiento como el metabolismo de los aislados de *E. coli* diarreagénica en presencia de cobre, plata, plomo o vancomicina a las 24 h, son los aminoácidos.

Los datos que se obtuvieron en este trabajo, muestran que la presencia de distintas fuentes de carbono genera una respuesta diferencial a los factores de estrés químico en cepas de *E. coli* diarreagénica. Sin embargo, la respuesta también está mediada por las diferencias genéticas entre los aislados.

## X. ANEXOS.

### I. Matriz dicotómica con los datos crecimiento de las cepas *E. coli* diarreagénica en las fuentes de carbono, en presencia de cobre 2 mM a las 24h.

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarreagenica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido Acético	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succínico Bromo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Histidina	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Urocánico	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
β-Metil-D-Glucósido	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido Cis-Aconítico	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succinámico	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Inosina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dextrina	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
L-Fucosa	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D- Psicosa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Acido Cítrico	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Acido Butírico α-Keto	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucuronamida	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
L-leucina	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Uridina	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Glicogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Galactosa	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D-Rafinosa	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido Fórmico	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Acido α-cetoglutárico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alaninamida	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
L-Ornitina	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Timidina	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Tween 40	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Gentiobiosa	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
L-Ramnosa	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0
Acido D-Galactónico Lactona	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido α-ceto Valérico	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
D-Alanina	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0
L-Fenilalanina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenietilamina	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Tween 80	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
α-D-Glucosa	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
D-Sorbito	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
Acido D-Galacturónico	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
Acido D,L-Láctico	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
L-Alanina	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
L-Prolina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
Putrescina	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
m-Inositol	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Sucrosa	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido D-Glucónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Malónico	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L-Alanilglicina	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
Acido L-Piroglutamico	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-glucosamina	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1

<b>α-D-Lactosa</b>	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
<b>D-Trehalosa</b>	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
<b>Acido D-Glucosaminico</b>	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Propiónico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>L-Asparagina</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D-Serina</b>	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
<b>2,3-Butanediol</b>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Adonitol</b>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<b>Lactulosa</b>	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
<b>Turanosa</b>	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
<b>Acido D-Glucurónico</b>	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
<b>Acido Quínico</b>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido L-Aspártico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>L-Serina</b>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
<b>Glicerol</b>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>L-Arabinosa</b>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
<b>Maltosa</b>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
<b>Xilitol</b>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
<b>Acido Butírico α-Hidroxi</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido D-Saccharico</b>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
<b>Acido L-Glutámico</b>	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
<b>L-Treonina</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
<b>Fosfato D,L-α-Glicerol</b>	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
<b>D-Arabitól</b>	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
<b>D-Manitol</b>	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
<b>Metil Piruvato</b>	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
<b>Acido Butírico β-Hidroxi</b>	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<b>Acido Sebácico</b>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<b>Acido Glicil-Laspártico</b>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>D,L-Carnitina</b>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>Glucosa-1-fosfato</b>	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>D-celobiosa</b>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>D-manosa</b>	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
<b>Mono-metil-succinato</b>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>Acido Butírico γ-Hidroxi</b>	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
<b>Acido succínico</b>	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Acido glicil-L-glutámico</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<b>Acido Butírico γ-Amino</b>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Glucosa-6-fosfato</b>	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0

1 = positivo (crecio en la fuente de carbono)

0 = negativo (no crecio en la fuente de carbono)

**II. Matriz dicotómica con los datos de crecimiento de las cepas *E. coli* diarregénica en las fuentes de carbono, en presencia de plata 0.025mM a las 24h.**

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarregénica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Acido Acético	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Acido Succínico Bromo	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Histidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Urocánico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
β-Metil-D-Glucósido	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Cis-Aconítico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succinámico	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inosina	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Dextrina	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Fucosa	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
D-Psicosa	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Cítrico	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Acido Butírico α-Keto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucuronamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-leucina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uridina	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Glicogen	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
D-Galactosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Rafinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Fórmico	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido α-cetoglutarico	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
L-Alaninamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ornitina	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Timidina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tween 40	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
Gentiobiosa	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
L-Ramnosa	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Acido D-Galactónico Lactona	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido α-ceto Valérico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Alanina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Fenilalanina	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenietilamina	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
α-D-Glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Sorbito	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido D-Galacturónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido D,L-Láctico	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Alanina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Putrescina	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
m-Inositol	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Sucrosa	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
Acido D-Glucónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Malónico	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
L-Alanilglicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido L-Piroglutamico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-glucosamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-D-Lactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Trehalosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Acido D-Glucosaminico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Acido Propiónico	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
L-Asparagina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Serina	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
2,3-Butanediol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactulosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Turanosa	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
Acido D-Glucurónico	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Quínico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Aspártico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Serina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maltosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xilitol	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
Acido Butírico $\alpha$ -Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido D-Saccharico	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Acido L-Glutámico	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Treonina	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
Fosfato D,L- $\alpha$ -Glicerol	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Arabitól	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Manitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metil Piruvato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Butírico $\beta$ -Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Sebácico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Glicil-Laspártico	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
D,L-Carnitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucosa-1-fosfato	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
D-celobiosa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
D-manosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mono-metil-succinato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Butírico $\gamma$ -Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido succínico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido glicil-L-glutámico	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Acido Butírico $\gamma$ -Amino	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Glucosa-6-fosfato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1 = positivo (crecio en la fuente de carbono)

0 = negativo (no crecio en la fuente de carbono)

III. Matriz dicotómica con los datos de crecimiento de las cepas *E. coli* diarregénica en las fuentes de carbono, en presencia de plomo 1.25 mM a las 24h.

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarregénica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Acético	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Acido Succínico Bromo	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1
L-Histidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Urocánico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
β-Metil-D-Glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Cis-Aconítico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succinámico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inosina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dextrina	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Fucosa	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
D-Psicosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Cítrico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Butírico α-Keto	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucuronamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-leucina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uridina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Glicogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Galactosa	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
D-Rafinosa	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
Acido Fórmico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido α-cetoglutarico	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alaninamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ornitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Timidina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tween 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Gentiobiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ramnososa	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Acido D-Galactónico Lactona	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
Acido α-ceto Valérico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Alanina	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
L-Fenilalanina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenietilamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
α-D-Glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Sorbito	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
Acido D-Galacturónico	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Acido D,L-Láctico	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
L-Alanina	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
L-Prolina	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
Putrescina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
m-Inositol	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrosa	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
Acido D-Glucónico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Malónico	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanilglicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Piroglutamico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
N-Acetil-D-glucosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



<b>α-D-Lactosa</b>	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D-Trehalosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Acido D-Glucosaminico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Propiónico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
<b>L-Asparagina</b>	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
<b>D-Serina</b>	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
<b>2,3-Butanediol</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Adonitol</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Lactulosa</b>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Turanosa</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido D-Glucurónico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Acido Quínico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido L-Aspártico</b>	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
<b>L-Serina</b>	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
<b>Glicerol</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>L-Arabinosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Maltosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Xilitol</b>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Butírico α-Hidroxi</b>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido D-Saccharico</b>	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
<b>Acido L-Glutámico</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>L-Treonina</b>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Fosfato D,L-α-Glicerol</b>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>D-Arabitól</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>D-Manitol</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Metil Piruvato</b>	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Acido Butírico β-Hidroxi</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Sebácico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Glicil-Laspártico</b>	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>D,L-Carnitina</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Glucosa-1-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D-celobiosa</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>D-manosa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Mono-metil-succinato</b>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
<b>Acido Butírico γ-Hidroxi</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido succínico</b>	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
<b>Acido glicil-L-glutámico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>Acido Butírico γ-Amino</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Glucosa-6-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1 = positivo (crecio en la fuente de carbono)

0 = negativo (no crecio en la fuente de carbono)

IV. Matriz dicotómica con los datos de crecimiento de las cepas *E. coli* diarregénica en las fuentes de carbono, en presencia de Vancomicina 0.08 µg mM a las 24h.

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarregénica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Acético	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Acido Succínico Bromo	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
L-Histidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Urocánico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
β-Metil-D-Glucósido	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Acido Cis-Aconítico	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succinámico	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inosina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dextrina	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
L-Fucosa	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
D-Psicosa	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Acido Cítrico	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Butírico α-Keto	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Glucuronamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-leucina	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Uridina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glicogen	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
D-Galactosa	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
D-Rafinosa	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
Acido Fórmico	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Acido α-cetoglutárico	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
L-Alaninamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ornitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Timidina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tween 40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
Gentiobiosa	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ramnosa	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
Acido D-Galactónico Lactona	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Acido α-ceto Valérico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Alanina	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
L-Fenilalanina	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Fenietilamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
α-D-Glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Sorbito	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Acido D-Galacturónico	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Acido D,L-Láctico	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Alanina	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
L-Prolina	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Putrescina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
m-Inositol	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrosa	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
Acido D-Glucónico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Malónico	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanilglicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Piroglutamico	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-glucosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

<b>α-D-Lactosa</b>	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>D-Trehalosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>Acido D-Glucosaminico</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Propiónico</b>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
<b>L-Asparagina</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>D-Serina</b>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<b>2,3-Butanediol</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Adonitol</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Lactulosa</b>	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
<b>Turanosa</b>	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<b>Acido D-Glucurónico</b>	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
<b>Acido Quínico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido L-Aspártico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>L-Serina</b>	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Glicerol</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>L-Arabinosa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Maltosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>Xilitol</b>	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Acido Butírico α-Hidroxi</b>	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<b>Acido D-Saccharico</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido L-Glutámico</b>	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>L-Treonina</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
<b>Fosfato D,L-α-Glicerol</b>	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D-Arabitól</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>D-Manitol</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>Metil Piruvato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Acido Butírico β-Hidroxi</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Sebácico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Glicil-Laspártico</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D,L-Carnitina</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Glucosa-1-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D-celobiosa</b>	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>D-manosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Mono-metil-succinato</b>	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Acido Butírico γ-Hidroxi</b>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido succínico</b>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Acido glicil-L-glutámico</b>	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
<b>Acido Butírico γ-Amino</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Glucosa-6-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1 = positivo (crecio en la fuente de carbono)

0 = negativo (no crecio en la fuente de carbono)

**V. Matriz dicotómica con los datos de metabolismo de las cepas *E. coli* diarregénica de las fuentes de carbono, en presencia de cobre 2 mM a las 24h.**

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarregénica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido Acético	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succínico Bromo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
L-Histidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Urocánico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
β-Metil-D-Glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido Cis-Aconítico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succinámico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inosina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Dextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
L-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D-Psicosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido Cítrico	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Acido Butírico α-Keto	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucuronamida	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
L-leucina	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uridina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Glicogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D-Galactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D-Rafinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido Fórmico	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido α-cetoglutárico	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
L-Alaninamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
L-Ornitina	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Timidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Tween 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Gentiobiosa	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ramnosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido D-Galactónico Lactona	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido α-ceto Valérico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
D-Alanina	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
L-Fenilalanina	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenietilamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
α-D-Glucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
D-Sorbito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido D-Galacturónico	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido D,L-Láctico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
L-Alanina	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
L-Prolina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
Putrescina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
m-Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido D-Glucónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido Malónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanilglicina	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Acido L-Piroglutamico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Acetil-D-glucosamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
α-D-Lactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
D-Trehalosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

Acido D-Glucosaminico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Propiónico	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
L-Asparagina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Serina	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
2,3-Butanediol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactulosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Turanosa	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido D-Glucurónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Acido Quínico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Aspártico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
L-Serina	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
L-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maltosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Xilitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Butírico $\alpha$ -Hidroxi	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido D-Saccharico	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
Acido L-Glutámico	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
L-Treonina	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
Fosfato D,L- $\alpha$ -Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Manitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Metil Piruvato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido Butírico $\beta$ -Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Sebácico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Glicil-Laspártico	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
D,L-Carnitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucosa-1-fosfato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
D-celobiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-manosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Mono-metil-succinato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido Butírico $\gamma$ -Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido succínico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido glicil-L-glutámico	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1
Acido Butírico $\gamma$ -Amino	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucosa-6-fosfato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

1 = positivo (metabolizó la fuente de carbono)

0 = negativo (no metabolizó la fuente de carbono)

**VI. Matriz dicotómica con los datos de metabolismo de las cepas *E. coli* diarregénica de las fuentes de carbono, en presencia de plata 0.025 mM a las 24h.**

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarregénica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Acido Acético	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Acido Succínico Bromo	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Histidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Urocánico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
β-Metil-D-Glucósido	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Cis-Aconítico	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succinámico	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inosina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dextrina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Fucosa	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
D-Psicosa	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Cítrico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Butírico α-Keto	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Glucuronamida	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-leucina	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uridina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glicogen	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Galactosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Rafinosa	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0
Acido Fórmico	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Acido α-cetoglutárico	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
L-Alaninamida	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Ornitina	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Timidina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tween 40	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
Gentiobiosa	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L-Ramnososa	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Acido D-Galactónico Lactona	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
Acido α-ceto Valérico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Alanina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Fenilalanina	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenietilamina	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
α-D-Glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Sorbito	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido D-Galacturónico	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido D,L-Láctico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Alanina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Prolina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Putrescina	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
m-Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrosa	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0
Acido D-Glucónico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Malónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanilglicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido L-Piroglutamico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
N-Acetil-D-glucosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

<b>α-D-Lactosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<b>D-Trehalosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Acido D-Glucosaminico</b>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Acido Propiónico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
<b>L-Asparagina</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>D-Serina</b>	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	
<b>2,3-Butanediol</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Adonitol</b>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
<b>Lactulosa</b>	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	
<b>Turanosa</b>	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	
<b>Acido D-Glucurónico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Acido Quínico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Acido L-Aspártico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>L-Serina</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Glicerol</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>L-Arabinosa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Maltosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Xilitol</b>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Acido Butírico α-Hidroxi</b>	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	
<b>Acido D-Saccharico</b>	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
<b>Acido L-Glutámico</b>	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
<b>L-Treonina</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
<b>Fosfato D,L-α-Glicerol</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>D-Arabitól</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
<b>D-Manitol</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Metil Piruvato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Acido Butírico β-Hidroxi</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
<b>Acido Sebácico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Acido Glicil-Laspártico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
<b>D,L-Carnitina</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Glucosa-1-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
<b>D-celobiosa</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>D-manosa</b>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Mono-metil-succinato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Acido Butírico γ-Hidroxi</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Acido succínico</b>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Acido glicil-L-glutámico</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
<b>Acido Butírico γ-Amino</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Glucosa-6-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

1 = positivo (metabolizó la fuente de carbono)

0 = negativo (no metabolizó la fuente de carbono)

VII. Matriz dicotómica con los datos de metabolismo de las cepas *E. coli* diarregénica de las fuentes de carbono, en presencia de plomo 1.25 mM a las 24h.

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarregénica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Acético	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Acido Succínico Bromo	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
L-Histidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
Acido Urocánico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
β-Metil-D-Glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Cis-Aconítico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Succinámico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inosina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dextrina	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Fucosa	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
D-Psicosa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Acido Cítrico	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Butírico α-Keto	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucuronamida	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
L-leucina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uridina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glicogen	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
D-Galactosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Rafinosa	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
Acido Fórmico	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido α-cetoglutárico	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
L-Alaninamida	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ornitina	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Timidina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tween 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Gentiobiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ramnosa	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Acido D-Galactónico Lactona	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
Acido α-ceto Valérico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Alanina	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
L-Fenilalanina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenietilamina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
α-D-Glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Sorbito	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
Acido D-Galacturónico	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Acido D,L-Láctico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
L-Alanina	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
L-Prolina	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
Putrescina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
m-Inositol	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrosa	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1
Acido D-Glucónico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Malónico	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanilglicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Piroglutamico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
N-Acetil-D-glucosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



<b>α-D-Lactosa</b>	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D-Trehalosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Acido D-Glucosaminico</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Propiónico</b>	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
<b>L-Asparagina</b>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>D-Serina</b>	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
<b>2,3-Butanediol</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Adonitol</b>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Lactulosa</b>	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Turanosa</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido D-Glucurónico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Acido Quínico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido L-Aspártico</b>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
<b>L-Serina</b>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Glicerol</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>L-Arabinosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Maltosa</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Xilitol</b>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Butírico α-Hidroxi</b>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>Acido D-Saccharico</b>	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
<b>Acido L-Glutámico</b>	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>L-Treonina</b>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
<b>Fosfato D,L-α-Glicerol</b>	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>D-Arabitól</b>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>D-Manitol</b>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Metil Piruvato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Acido Butírico β-Hidroxi</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Sebácico</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido Glicil-Laspártico</b>	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D,L-Carnitina</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Glucosa-1-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>D-celobiosa</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>D-manosa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Mono-metil-succinato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Acido Butírico γ-Hidroxi</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Acido succínico</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<b>Acido glicil-L-glutámico</b>	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>Acido Butírico γ-Amino</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Glucosa-6-fosfato</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1 = positivo (metabolizó la fuente de carbono)

0 = negativo (no metabolizó la fuente de carbono)

**VIII. Matriz dicotómica con los datos de metabolismo de las cepas *E. coli* diarregénica de las carbono, en presencia de Vancomicina 0.08 µg a las 24h.**

Fuentes de carbono	Cepas de <i>E. coli</i> diarregénica																
	4	6	10	13	14	18	20	23	24	53	54	55	57	ETEC-ST	ETEC-LT	EPEC	EIEC
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Melibiosa	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
Acido Acético	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Acido Fenilacético p-Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Acido Succínico Bromo	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
L-Histidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Urocánico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Ciclodextrina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
β-Metil-D-Glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Cis-Aconítico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Itacónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Acido Succinámico	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroxi-L-prolina	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Inosina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dextrina	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
L-Fucosa	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
D-Psicosa	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Acido Cítrico	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Acido Butírico α-Keto	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucuronamida	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
L-leucina	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Uridina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glicogen	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
D-Galactosa	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Rafinosa	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
Acido Fórmico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido α-cetoglutarico	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
L-Alaninamida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ornitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Timidina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tween 40	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
Gentiobiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ramnosa	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
Acido D-Galactónico Lactona	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
Acido α-ceto Valérico	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
D-Alanina	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
L-Fenilalanina	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenietilamina	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Tween 80	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
α-D-Glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Sorbito	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Acido D-Galacturónico	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido D,L-Láctico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Alanina	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
L-Prolina	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Putrescina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-galactosamina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
m-Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrosa	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
Acido D-Glucónico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Malónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanilglicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Piroglutamico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Aminoetanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-D-glucosamina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
α-D-Lactosa	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
D-Trehalosa	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Acido D-Glucosaminico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Acido Propiónico	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
L-Asparagina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-Serina	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
2,3-Butanediol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Lactulosa	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Turanosa	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido D-Glucurónico	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Acido Quínico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Aspártico	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
L-Serina	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glicerol	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Arabinosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Maltosa	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
Xilitol	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Acido Butírico α-Hidroxi	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
Acido D-Saccharico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido L-Glutámico	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L-Treonina	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
Fosfato D,L-α-Glicerol	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D-Manitol	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Metil Piruvato	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acido Butírico β-Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Sebácico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido Glicil-Laspártico	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
D,L-Carnitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucosa-1-fosfato	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-celobiosa	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
D-manosa	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mono-metil-succinato	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Acido Butírico γ-Hidroxi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido succínico	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Acido glicil-L-glutámico	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
Acido Butírico γ-Amino	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucosa-6-fosfato	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1 = positivo (metabolizó la fuente de carbono)

0 = negativo (no metabolizó la fuente de carbono)

## XI. BIBLIOGRAFÍA.

Aruji Yuko, Tamura K., Sugita S. and Adachi Y. 2004. Intestinal microflora in 45 crows in ueno zoo and the *in vitro* susceptibilites of 29 *Escherichia coli* isolates of 14 antimicrobial agents. J. Vet. Med. Sci 66(10); 1283-1286.

Bambeke Françoise Van. 2004. Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives Bambeke. Current Opinion in Pharmacology. 4: 471–478.

Bernstein Alan, Rolfe R. and Onodera K. 1972. Pleiotropic Properties and Genetic Organization of the *tolA*, *B* Locus of *Escherichia coli* K-12. Journal of. Bacteriology. 112 (1): 74-83.

Bochner, B. 1989. Breathprints at the microbial level. American Society for Microbiology News. 55: 536-539.

Bowler R. J., Braude, R., Mitchell K. G., and Cassidy J. 1955. High copper mineral mixture for fattening pigs. Chem. Ind. (London) 74:601.

Brock , Madigan, Michael y Martinko, John y Parker, Jack. 2003. Biología de los Microorganismos 10<sup>a</sup> ed. Edit. Mc Wrrall Hil. España. 1011.

Bruce Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. 2004. Molecular Biology of the cell. 4<sup>th</sup>. ed. Ed. Omega. Barcelona, España. 1452 pp.

Campos Leila, M. R. Franzolin, L. R. Trabulsi. 2004. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rió de Janeiro. 99(6): 545-552.

Cañizares-Villanueva Rosa O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42:131-143.

Cardonha Angela, R. Vieira, D. Rodrigues, A. Macrae, G. Peirano, G. Teophilo, 2004. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. International Microbiology. 7:213-218.

Calormiris, J., Armstrong, J.L., and Seidler, R.J. (1984). Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. Appl Environ Microbiol 47(6): 1238-1242.

Cervantez Carlos. 2006. 35<sup>o</sup> Expulsión de metales pesados en bacterias. Congreso Nacional de Microbiología. Oaxtepec Mor., México. 88.

Cué Brugueras Manuel y Morejón García Moisés. 1998. Antibacterianos de acción sistémica. parte I. antibióticos betalactámicos Rev Cubana Med Gen Integr; 14(4):347-61.

Cha Jae-Soon and Cooksey Donald A. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins (copper-binding proteins/blue copper proteins). *Microbiology*. 88: 8915-8919.

Chang Don E., Smalley D., Tucker L., Leatham M., Norris W., Stevenson S., Anderson, Grissom J., Laux D., Cohen P. and Conway T. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine Dong-Eun, PNAS. 101(19): 7427–7432.

Choudhury P. and Kumar R. 1996. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of enteropathogenic organisms isolated from coastal region of deltaic Sunderbans. *Indian J Med Res*. 104:148-51.

Dehesa N. 1991. Diarrea crónica. En *Diagnóstico y Terapéutica en Medicina Interna*. G. Llamas Esperón (ed). México: Méndez Cervantes, pp 574-579.

Dzierżanowska-Fangrat Katarzyna, Semczuk K., Łopaciuk U. Kurlenda J., Małafi E., Puacz E., Stalmaska-Dworak E., Dzierżanowska D. 2005 Antimicrobial susceptibility of aerobic microorganisms isolated from intraabdominal infections in pediatric patients in Poland. *Med Sci Monit*, 11(5); 241-245.

Filali B., J.Taoufik, Y. Zeroual, F. Dzairi, M. Talbi and M. Blaghen. 2000. Waste water bacterial isolate resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*. 41: 151-156.

Gao Yong. 2001. Glycopeptide antibiotics and development of inhibitors to overcome vancomycin resistance. *Natural Product Reports*, 2002, 19; 100–107.

Hardman Joel, Limbird L. 2005. Las bases farmacológicas de la terapéutica Goodman and Gilman's. Ed Mc Wraill Hill, 10 ed. México. 1215-1217.

Harnett Norma and Gyles C., 1984. Resistance to Drugs and Heavy Metals, Colicin Production, and Biochemical Characteristics of Selected Bovine and Porcine *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5): 930-935.

Hirvas Laura, Nurminen M., Helander I., Vuorio R. and Vaara M. 1997. The lipid A biosynthesis deficiency of the *Escherichia coli* antibiotic-supersensitive mutant LH530 is suppressed by a novel locus, ORF195 *Microbiology*. 143: 73–81.

.Karbasizaed Vajiheh, N. Badami, G. Emtiazi. 2003. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *African Journal of Biotechnology* 2(10); 379-383.

Keasling J. and Hupf G. 1996. Genetic Manipulation of Polyphosphate Metabolism Affects Cadmium Tolerance in *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology. Applied and Environmental Microbiology*. 62(2); 743–746.

Korsak Dorota, Liebscher S., and Vollmer W. 2005. Susceptibility to Antibiotics and  $\beta$ -Lactamase Induction in Murein Hydrolase Mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(4): 1404–1409.

Lazar V., Cernat R., Balotescu C., Cotar A., Coipan E., Cojocaru C. 2002. Correlation between multiple antibiotic resistance and heavy-metal tolerance among some E.coli strains isolated from polluted waters. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol*. 47(3-4):155-60.

Marine. 1991. Diarrea aguda. En: *Diagnóstico y Terapéutica en Medicina Interna*. G. Llamas Esperón (ed). México: Méndez Cervantes pp 571-574.

Mojica Hernandez M. Fani. 2006. Sensibilidad a antibioticos y metales pesados en aislados clínicos de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura. 179.

Murray Barbara, J. Mathewson, H. Dupont, C. Ericsson and R. Reves. 1990. Emergence of Resistant Fecal *Escherichia coli* in Travelers Not Taking Prophylactic Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 34(4); 515-518.

Nataro, J.P. and Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Rev*. 11:142-201.

Nies, D.H., and Silver, S. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology* 14: 186-199.

Nikaido Hiroshi and Marti Vaara. 1985. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 49 (1): 1-32.

Nikaido Hiroshi. 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4); 593–656.

Niklinska Maria, M Chodak, R. Laskowski. 2006. Pollution-induced community tolerante of microorganisms from forest soil organic layers polluted with Zn or Cu. *Elsevier*. 32: 265-272.

Norma M., Harnett and Carlton L., Gyles.1984. Resistance to Drugs and Metals, Colicin Production, and Biochemical Characteristics of Selected Bovine and Porcine *Escherichia coli* strains. 48:930-945.

Nguyen Trung, P. Van Le, C. H. Le and A. Weintraub. 2005. Antibiotic Resistance in Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains Isolated from Children in Hanoi, Vietnam. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(2); 816–819.

Rozman Farrera. 2000. Medicina interna. Ed. Ediciones Harcourt 14<sup>a</sup> ed. España. 2209

Gamo Masashi and Shoji Tadashi. 1999. A Method of Profiling Microbial Communities Based on a Most-Probable-Number Assay That Uses BIOLOG Plates and Multiple Sole Carbon Sources. Applied and Environmental Microbiology. 65(10); 4419–4424.

Garland, J. L., and Mills, A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2351-2359.

Pallecchi Lucia, M. Malossi, A. Mantella, E. Gotuzzo, C. Trigo, A. Bartoloni, F. Paradisi, G. Kronvall and G. M. Rossolini. 2004. Detection of CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamase Genes in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children in Bolivia and Peru. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48(12); 4556–4561.

Park Seon, Lin C., and Walsh C. 1996. Gain of D-alanyl-D-lactate or D-lactyl-D-alanine Synthetase Activities in Three Active-Site Mutants of the *Escherichia coli* D-ALANYL-D-alanine Ligase B. Biochemistry. 35(32):10464-10471.

Tariq Nabia, Jaffery Tara, Ayub Rukhsana, Alam Ali Y., Javid Mahmud H., and Shafique Shamsa. 2006. Frequency and antimicrobial susceptibility of aerobic bacterial vaginal isolates. Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan. 16(3); 196-199.

Tam, R. and Saier, M. 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. Microbiol Rev 57 (2): 320-46.

Tracy Breca S., Edwards K., y Eisenstark A. 2002. Carbon and nitrogen substrate utilization by archival *Salmonella typhimurium* LT2 cells. Research article. *BMC Evolutionary Biology*. 2:14

Teng Lee, P. R. Hsueh, S. J. Liaw, S. L. Ho, J. C. Tsai. 2004. Genetic detection diarrheagenetic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *Journals Microbiology Immunology Infect.* 37:327-334.

Torres A. G., X. Zhou and J. B. Kaper. 2005. MINIREVIEW. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. *Infection and Immunity.* 73(1); 18–29.

Secretaría de Salud. 2003 En su página de internet: [www.salud.gob.mx/](http://www.salud.gob.mx/)

Schroeder Carl M., Cuiwei Zhao, Chitrita DebRoy, Jocelyn Torcolini, Shaohua Zhao, David G. White, David D. Wagner, Patrick F. McDermott, Robert D. Walker, and Jianghong Meng. 2002. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2); 576–581.

Shlaes David, Shlaes J., Davies I., and Williamson't R. 1989. *Escherichia coli* Susceptible to Glycopeptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 33 (2): 192-197.

SY Qi., Sukupolvi S., O'Connor C. 1991. Outer membrane permeability of *Escherichia coli* K12: isolation, cloning and mapping of suppressors of a defined antibiotic-hypersensitive mutant. *Mol Gen Genet.* 229(3):421-7.

Ug A. and Ceylan O. 2003. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Arch Med Res.* 34(2):130-6.

Vaara Martti and Nurminen Marjatta. 1999. Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(6): 1459–1462.

Vargas Terán Moisés y Del Barrio Reyna Leopoldo. 2005. *Salud Pública Veterinaria e Inocuidad de los Alimentos en América Latina y el Caribe.* I Global Feed & Food Congress. Sao Paulo, Brazil, 11 -13.

Vila Jordi, M. Vargas, C. Casals, H. Urassa. 1999. Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Children under the Age of 5 Years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 43(12); 3022–3024.

Rosales A. 2004. Tipificación polifásica de aislados clínicos de *Escherichia coli* diarreagénica. 2004. Tesis de licenciatura. 52.



Ryan O., Prado M., and Pickering LK. 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing in world. *Semin Pediatr Infect Dis.* 16(2):125-36.

Smalla Kornelia, Wachtendorf U., Heuer H. , Liu W. and Forney L. Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(4); 1220–1225.

Silver Simon y Phung Le. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganicions. *Journals Industrial Microbiol and Biotechnol.* 32: 587–605.

Singh SK., Grass G., Rensing C., Montfort WR. 2004. Cuprous oxidase activity of Cue O from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 186(22); 7815-7817.

Spain Anne. 2003. Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research.* 2; 1-6.