



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EFFECTO ANTAGÓNICO DE *Pseudomonas* spp. AISLADAS DE LAS
POZAS
TERMALES “AGUAS DE MOISÉS”, CARIACO, MUNICIPIO RIBERO,
ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

JOHANA ALEJANDRA MOSQUERA GUÉDEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

Cumaná, 2012

INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Cepas bacterianas	7
Reactivación de la cepa conservada.....	7
Observación macroscópica	7
Observación microscópica	7
Pruebas bioquímicas	8
Antagonismo bacteriano	8
Los aislados de <i>Pseudomonas</i> se enfrentaron a cepas indicadoras provenientes del CVCM: <i>Escherichia coli</i> K12 CVCM 178, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CVCM 787, <i>Bacillus subtilis</i> CVCM 591 y <i>Staphylococcus aureus</i> CVCM 636.....	8
Método de doble capa en agar.....	8
Método de difusión de discos de papel filtro en agar.....	9
Análisis estadístico.....	10
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	24

RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
APÉNDICE	30
HOJAS DE METADATOS	37

DEDICATORIA

A

Dios todopoderoso, por haberme dado la dicha de conocer lo agraciado de la vida y porque cada una de mis metas las he visto realizarse con el mejor de los éxitos.

Mis padres Alejandrina y Joel, ambos decidieron traerme a este mundo, me cuidaron y enseñaron lo bueno y malo del vivir cada día, a ellos les agradezco y les debo todo el éxito que hoy día he logrado con tanto esfuerzo. Por todas esas maravillosas cosas les doy las gracias por ser unos padres ejemplares.

Mi bebé Johan, que Dios lo mando en el mejor momento de mi vida y que por él mi esfuerzo tuvo que ser mayor.

Mi esposo William, por su paciencia y apoyo. Juntos hemos madurado y poco a poco salido adelante, tomados de la mano nuestros éxitos han sido grandes.

Mis tias Omaira y Nellito, quienes estuvieron a mi lado desde el comienzo de mi carrera, su ayuda y apoyo incondicional lograron que jamás decayera.

Mis hermanas Vanessa y Carmen por su gran apoyo y consejos a lo largo de mi carrera universitaria.

Mis suegros, en especial Sr. José por sus consejos oportunos en los momentos más difíciles.

Y a las que no pueden faltar, mis grandes amigas, Edith, Pierina, Yohanna y Vicmarys. Cómplices de toda esta historia tan hermosa como fue la de estudiantes, siempre estuvieron a mi lado. Compartimos momentos que jamás olvidaré y que recuerdo con mucha alegría. ¡Amigas son las mejores!

¡A todos, gracias por formar parte de este grandioso éxito!

AGRADECIMIENTOS

A

La profesora Yasmina Araque, por ser vocera de este grandioso éxito, gracias por tender su mano hacia mí, por su apoyo incondicional.

La profesora Elsa Salazar, por aceptar ayudar en la realización de este trabajo, su experiencia y consejos fueron de mucha ayuda.

La profesora Dina Antón, por la colaboración prestada en el laboratorio de bacteriología clínica, donde pase la mayoría del tiempo realizando el análisis de mi tesis.

Todos aquellos que de forma desinteresada me apoyaron y dieron un aire de aliento en los momentos más difíciles de mi carrera, sobre todo en la realización de mi tesis.

Mi compañera Rita Loero, por tenderme la mano en los últimos momentos de mi carrera, por sus consejos que fueron de gran ayuda y porque su lucha constante me sirvió de ejemplo.

¡Muchas gracias!

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otras especies de <i>Pseudomonas</i> , productoras de efecto antagónico, aislados de 3 piscinas del balneario “Aguas de Moisés”, Cariaco, Municipio Ribero, estado sucre.	11
Tabla 2. Efecto antagónico producido por cepas de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de 3 pozas del balneario “Aguas de Moisés”, Cariaco, Municipio Ribero, estado Sucre., crecidas en medio con tripticasa de soya, sin azúcar añadido, contra cuatro cepas indicadoras del centro venezolano de colecciones de microorganismos, a través de los métodos doble capa y difusión de discos en agar.	12
Tabla 3. Efecto antagónico producido por cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. provenientes de 3 pozas del balneario “Aguas de Moisés”, Cariaco, municipio Ribero, estado sucre., crecidas en tripticasa de soya, sin azúcar añadido, contra cepas indicadoras del centro venezolano de colecciones de microorganismos, a través de los métodos doble capa y difusión de discos en agar.	13

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto antagónico de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otras especies de <i>Pseudomonas</i> crecidas en diferentes sustratos contra cuatro cepas provenientes del centro venezolano de colecciones de microorganismos en relación al tiempo y a la fase de crecimiento, a través del método difusión de discos en agar.	14
Figura 2. Diámetros promedios (mm) de los halos de inhibición producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> crecidas en diferentes sustratos, frente a diferentes bacterias indicadoras, mediante el método de doble capa con 24 horas de incubación.....	I
Figura 3. Diámetros promedios (mm) de los halos de inhibición producidos por cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. crecidas en medios con diferentes sustratos, frente a diferentes bacterias indicadoras, mediante el método de doble capa al cabo de 24 horas de incubación.....	16

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto antagónico de 17 cepas del género *Pseudomonas*, aisladas de tres piscinas del balneario “Aguas de Moisés”, Municipio Ribero, estado Sucre, Venezuela, contra cuatro cepas indicadoras provenientes del centro venezolano de colecciones de microorganismos (CVCM) en distintos sustratos, también, se midió la acción de diferentes sustratos en la actividad inhibitoria, en relación a la fase de crecimiento de las cepas productoras a cuatro horas distintas de incubación (6,12,18 y 24). La determinación del efecto antagónico de dichas cepas se realizó mediante los métodos de difusión de discos en agar y doble capa. Se aplicó un análisis de varianza de doble vía (ANOVA) con un nivel de confianza de 95%. Las 17 cepas del género *Pseudomonas* mostraron actividad antagónica contra cepas indicadoras *Escherichia coli* K12 CVCM 178, *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 787, *Bacillus subtilis* CVCM 591 y *Staphylococcus aureus* CVCM 636. Los mayores halos de inhibición producidos por cepas de *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* fueron contra las cepas indicadoras *S. aureus* y *B. subtilis*. A través del método de doble capa, se evidenció un mayor efecto antagónico por el género *Pseudomonas* contra cepas de distintos géneros bacterianos, estas cepas de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* spp. produjeron un mayor efecto inhibitorio en los medios con glucosa añadida en relación a los demás sustratos empleados. La actividad antagónica se produjo mejor en la fase estacionaria de crecimiento, donde las cepas produjeron un mayor efecto antagónico contra las cepas indicadoras.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Pseudomonas* se definen como bacilos Gram negativos, aerobios estrictos, móviles, constituidos por uno o varios flagelos polares; producen pigmentos solubles en agua, son catalasa y oxidasa positiva, con ausencia de formación de gas a partir de glucosa y capaces de crecer a temperaturas entre 4 y 43°C (Pumarola *et al.*, 1992; Rodríguez, 1997).

Actualmente, la clasificación para los miembros del género *Pseudomonas* está basada en la homología de secuencias de ARN, se ubica taxonómicamente en el reino Procariota, orden Pseudomonadales, familia *Pseudomonadaceae* y está conformada por cinco grupos, donde se incluye el grupo fluorescente (Grupo I ARNr), constituido a su vez por las especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas veronii* y *Pseudomonas monteilii* (Koneman *et al.*, 2008).

Las especies *P. fluorescens* y *P. putida* son recuperadas con menor frecuencia en muestras humanas, con respecto a *P. aeruginosa*. Sin embargo, *P. fluorescens* es considerada, igualmente, como típico patógeno oportunista para el hombre; asociado a septicemia ocasionada por diversas causas como heridas, transfusiones sanguíneas, infección post-operatorias y enfermedades inflamatorias de la pelvis. Estas bacterias se encuentran en el ambiente hospitalario como contaminantes de fuentes de agua, soluciones de amonio cuaternario, suelo, entre otros (Pájaro *et al.*, 1995; Esnard y Díaz, 1997). La temperatura de crecimiento oscila entre 30 y 37°C; sin embargo, *P. fluorescens* se diferencia de *P. putida* en la capacidad de desarrollarse a temperatura de 4°C, reducir nitratos e hidrolizar la gelatina. Ambas especies producen fluoresceína pero no piocianina (Murray *et al.*, 1999; Álvarez, 2001).

En el caso de *P. aeruginosa*, su papel como germen intrahospitalario radica en su relativa resistencia a los antisépticos y antimicrobianos. Todo esto determina que sea común encontrar y aislar estas especies como parte de la flora de pacientes

hospitalizados, sobre todo al colonizar el tracto respiratorio de estos con asistencia respiratoria. *P. aeruginosa* es una bacteria oportunista, que causa en su mayoría infecciones asociadas con cambios de los mecanismos de defensas locales o sistémicas del hospedero. Las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* pueden afectar múltiples órganos y sistemas, cuyas localizaciones más frecuentes son: el aparato respiratorio, urinario, ótico, ocular y cutáneo (Martínez, 2001; Vergara *et al.*, 2007).

Los representantes del género *Pseudomonas* tienen requerimientos nutricionales muy sencillos y se desarrollan organotróficamente a valores neutros de pH y a temperaturas entre los límites mesófilos. Una de las propiedades más sorprendentes del género *Pseudomonas* es la amplia variedad de compuestos orgánicos que utiliza como fuente de carbono y como donadores de electrones para la generación de energía. *Pseudomonas* se encuentra ampliamente distribuida en diversos ambientes, acuáticos, terrestres y mesotermales donde, probablemente, es responsable de la degradación aerobia de muchos compuestos solubles, derivados de la degradación de materias vegetales y animales (Mosso *et al.*, 1994; Broocks *et al.*, 2001).

La conformación genética del género *Pseudomonas* es muy versátil por poseer operones, elementos móviles como transposones y plásmidos, que permiten la transferencia de material genético y, por lo tanto, la rápida adaptación frente a la presencia de agentes contaminantes nuevos en un ecosistema en particular (Ferrera *et al.*, 2006).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físicoquímicas y biológicas. Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes; así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos. Por ello, no es sorprendente que se considere a las bacterias de este género un paradigma de versatilidad metabólica, y microorganismos claves en el

reciclado de materia orgánica en los compartimentos aeróbicos de los ecosistemas, jugando, por tanto, un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental (Cornelis, 2008).

La degradación de hidrocarburos por parte del género *Pseudomonas* está dado, principalmente, por condiciones de pH adecuados, ya que podrían afectar la biodisponibilidad de fuentes de carbono y energía. Este factor se constituye como uno de los indicadores del proceso de biocontrol, y aunque *Pseudomonas* se puede adaptar fácilmente a condiciones extremas, estas cepas microbianas tienen un determinado rango de tolerancia. A pH extremadamente alcalinos o ácidos, la biodegradación se hace lenta. Generalmente, los suelos contaminados por hidrocarburos tienden a ser ácidos, lo cual limita el crecimiento y la actividad de *Pseudomonas* (Fernández, 2001; Gómez *et al.*, 2008).

Además de las propiedades metabólicas antes descritas, las especies del género *Pseudomonas* a nivel de ambientes acuáticos y terrestres producen un efecto antagónico frente a otros microorganismos, esta acción puede ser aprovechada como forma de control biológico de patógenos. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas, para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de éstos son, la producción de moléculas quelantes de hierro (sideróforos), ácidos orgánicos y bacteriocinas (Pellón *et al.*, 2001; Muñoz, 2003; Chaves, 2007).

Las bacteriocinas se definen como péptidos biológicamente activos, que presentan propiedades bactericidas contra miembros de la misma especie que la produjo o especies muy relacionadas con la cepa productora. Representando a este grupo de bacterias productoras de bacteriocinas, se encuentran especies como *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (González *et al.*, 2003).

Un gran número de bacteriocinas han sido identificadas y caracterizadas en distintos grupos, de acuerdo con su masa molecular y estabilidad al calor, mostrando un amplio o

reducido campo de acción antimicrobiano, según el medio donde actúan y juegan un papel muy importante en el ecosistema, además, representan un gran potencial para la industria alimenticia, debido a que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros, ya que al degradarse no forman compuestos secundarios (Meriño *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003).

La función de las bacteriocinas consiste en capacitar a las bacterias productoras para sobrevivir frente a sus competidores, ya que como antagonistas, impiden o limitan la invasión de una cepa dentro de una comunidad microbiana establecida; cuando las fuentes de nutrientes son limitadas, estas células productoras de bacteriocinas lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local. Se ha observado, que algunas bacteriocinas actúan como péptidos de señal para la expresión de genes (Moreira, 1993; Arquéz, 2003; Muñoz, 2003).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas es muy diverso, puede involucrar bloqueos metabólicos, formación de poros en la membrana celular, cambios en la permeabilidad de la membrana celular, actividad de la nucleasa contra blancos de ADN, ARN y ARNt, entre otros (Muñoz, 2003).

Generalmente, hay producción de bacteriocinas cuando la cepa productora se cultiva a una temperatura óptima de crecimiento. El desarrollo de cepas productoras a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocinas, y algunas veces excluir, irreversiblemente, esta propiedad. Otras investigaciones, también han descrito pérdidas sustanciales en la actividad de las bacteriocinas de cultivos incubados durante mucho tiempo, este efecto, posiblemente, ocurra por la existencia de inactivadores específicos de las bacteriocinas, digestión enzimática o a la reabsorción de la bacteriocina por la cepa productora (Moreira, 1993).

Las bacteriocinas pueden ser codificadas en el cromosoma o en plásmidos; la piocina es una bacteriocina producida por *P. aeruginosa* y se encuentra localizada en el cromosoma

(Muñoz, 2003).

La producción máxima de bacteriocina puede obtenerse suplementando un medio de cultivo con factores limitantes del crecimiento como azúcares, vitaminas y fuentes de nitrógeno, regulando el pH y eligiendo las mejores condiciones del medio, para aumentar la eficiencia del proceso (Ogunbanwo *et al.*, 2003).

Otros compuestos de suma importancia producidos por cepas del género *Pseudomonas* son los sideróforos, capaces de capturar el hierro en la rizosfera en condiciones limitantes de este elemento y le dan a las cepas de *Pseudomonas* la capacidad de tener propiedades fungistáticas y bacteriostáticas cuando la concentración de hierro es baja, ayudándolas a controlar microorganismos patógenos que se encuentran en el suelo con el fin de estimular el crecimiento de las plantas (Pérez *et al.*, 2001; Hass y Défago, 2005).

En los últimos años, en Venezuela, particularmente en el estado Sucre, se han realizado estudios que evalúan la actividad antagónica de bacilos Gram negativos no fermentadores, principalmente, en cepas del género *Pseudomonas*, tanto en el área asistencial como a nivel ambiental (Araque *et al.*, 2007; Morales, 2009; Barrios, 2010).

Araque *et al.* (2007) demostraron el antagonismo de aislados intrahospitalarios de *Burkholderia cepacia* contra bacterias y hongos de ambientes hospitalarios, los cuales representan un factor importante en la colonización de áreas críticas, facilitando la aparición de cuadros infecciosos en pacientes allí recluidos.

Morales (2009) determinó la actividad antagónica en aislados clínicos de *P. aeruginosa* contra cepas del centro venezolano de colecciones de microorganismos (CVCM) y enterobacterias aisladas de los coprocultivos, lo que demuestra la capacidad de colonización de esta bacteria.

Barrios (2010) comprobó la presencia de sustancias extracelulares antagónicas en cepas de *Pseudomonas* spp., provenientes de la cuenca del río Manzanares, que a futuro, pudieran emplearse como estrategia de biocontrol de la densidad bacteriana de este tipo de ambientes, debido a su capacidad para inhibir especies patógenas.

En el presente estudio se propuso evaluar la producción de sustancias antagónicas en cepas de *Pseudomonas* sp., provenientes de sedimentos y aguas termales del balneario “Aguas de Moisés”, municipio Ribero, estado Sucre, las cuales, pudieran ser utilizadas, a mediano y largo plazo, como agentes de biocontrol de otros microorganismos patógenos presentes en los balnearios; así como, en la degradación de compuestos tóxicos que contengan estas aguas y suelos.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Para la realización del presente estudio se analizaron 21 aislados bacterianos previamente identificados como *Pseudomonas* spp., por medio de pruebas bioquímicas convencionales, obtenidos de aguas y sedimentos procedentes de diferentes pozas ubicadas en el balneario “Aguas de Moisés”, municipio Ribero, vía Cariaco/Casanay, estado Sucre, durante el periodo comprendido entre octubre del año 2009 y enero de 2010. Las cuales se encuentran debidamente conservadas a temperatura ambiente en el laboratorio de bacteriología clínica.

Reactivación de la cepa conservada

Cada cepa proveniente del agar conservación se repicó en tubos con 3 ml de caldo tripticasa de soya, y se incubó a 37°C por 24 horas en aerobiosis. Posteriormente, se comprobó el crecimiento bacteriano de cada cepa y se sembraron en agar MacConkey (MC), luego, se incubaron a 37°C por 24 horas en aerobiosis (Koneman *et al.*, 2008).

Observación macroscópica

A partir del crecimiento puro de las especies bacterianas en el agar MC, se procedió a verificar las características morfológicas de las colonias, tales como el tamaño, aspecto, forma, color, olor, producción de pigmentos y la fermentación o no de la lactosa, a fin de verificar las características particulares de la especie en estudio (Koneman *et al.*, 2008).

Observación microscópica

A partir del crecimiento puro de las diferentes especies bacterianas en el agar MC, se realizó la técnica de coloración del Gram, con la finalidad de observar al microscopio la morfología celular y la afinidad tintorial (Hucker y Conn, 1923).

Pruebas bioquímicas

La identificación bioquímica para *Pseudomonas* spp. se realizó de acuerdo a los procedimientos propuestos por Mac Faddin (2003) y Koneman *et al.* (2008) para bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), empleándose las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa, fermentación de azúcares, motilidad, oxidación de azúcares (glucosa, maltosa, xilosa, manitol y lactosa), reducción de nitratos, descarboxilación de la lisina, hidrólisis de la arginina, licuefacción de la gelatina y crecimiento a 42°C.

Antagonismo bacteriano

Una vez identificadas las cepas como *Pseudomonas* spp., se procedió a la detección del efecto antagónico de las mismas a través del método de doble capa en agar (Dopazo *et al.*, 1998) y la técnica de difusión de discos en agar (Lewus y Montville, 1991). En ambos métodos se emplearon diferentes azúcares como fuente de carbono (glucosa, maltosa, sacarosa, y manitol), los cuales se adicionaron, por separado, a una concentración de 0,2 %p/v, con el propósito de determinar el efecto del sustrato en la actividad antagónica.

Los aislados de *Pseudomonas* se enfrentaron a cepas indicadoras provenientes del CVCM: *Escherichia coli* K12 CVCM 178, *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 787, *Bacillus subtilis* CVCM 591 y *Staphylococcus aureus* CVCM 636.

Método de doble capa en agar

Con el objeto de determinar el efecto antagónico en cepas de *Pseudomonas* spp. contra cuatro cepas bacterianas del CVCM, se empleó el método de doble capa descrita por Dopazo *et al.* (1998). Inicialmente las cepas estudiadas (posibles productoras) previamente conservadas, se inocularon en agar tripticasa de soya (TS) sin carbohidrato añadido, y luego, se incubaron a 37°C, durante 24 horas, en aerobiosis. Posteriormente, se procedió a tomar de 3 a 5 colonias aisladas y se colocaron en 5 ml de caldo TS hasta que alcanzaron una turbidez de 0,5 en la escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Luego, se tomaron 10 µl de dichas suspensiones y se dispensaron en placas con agar TS

con su respectivo azúcar (glucosa, sacarosa, manitol, maltosa) añadido, colocadas en 4 puntos equidistantes. Seguidamente, las placas fueron incubadas a 37°C por un período de 24 horas en aerobiosis. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y verificado el crecimiento de las posibles productoras, en las placas de agar (con las cepas en estudio), se expusieron a vapores de cloroformo por 30 minutos. Posteriormente, se procedió a cubrir cada placa con 8 ml de agar TS fundido, que previamente fue inoculado con 100 µl de la cepa indicadora. Una vez solidificadas, las placas sembradas se incubaron por 24 horas a 37°C, en aerobiosis.

Método de difusión de discos de papel filtro en agar

El efecto antagónico también se evaluó mediante el empleo de extractos acuosos obtenidos por centrifugación de cultivos en caldo de las cepas de *Pseudomonas* spp. incubados a distintos tiempos (6,12,18 y 24 horas), contra las cepas del CVCM, anteriormente descritas, empleando el método de difusión de discos de papel filtro en agar (Lewus y Montville, 1991), siguiendo el procedimiento de la siguiente manera: Se inocularon de 3 a 5 colonias de las cepas aisladas (posible productora) previamente conservadas, en 5 tubos con caldo TS, a 4 de éstos se les añadió 0,2% del azúcar a emplear, siendo el control el medio con caldo TS, sin azúcar, con la cepa inoculada. Luego, se procedió a incubarlos a 37°C por 6, 12, 18 y 24 horas, a fin de determinar la producción de sustancias antagónicas en relación a la fase de crecimiento de las posibles cepas productoras. Transcurridos los respectivos tiempos de incubación, se tomó 1 ml de los caldos de cultivo y se añadió en tubos Eppendorf, se centrifugó por 5 minutos a una velocidad de 3 000 rpm, para retirar el mayor número de células y obtener el sobrenadante, del cual se tomaron 10 µl, dispensándolo en discos de papel filtro de 5 mm de diámetro, los cuales se colocaron en las placas con agar TS, previamente sembradas con un cultivo de 24 horas de las cepas indicadoras, respectivamente (*E. coli* K12 CVCM 178, *P. aeruginosa* CVCM 787, *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 636). Luego, las placas fueron incubadas por 24 horas a 37°C en aerobiosis.

La lectura se llevó a cabo midiendo con una regla milimétrica, y se interpretó como cepa

productora del efecto antagónico aquella donde se observó la producción de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano (cepa indicadora) de cualquier tamaño alrededor de la posible productora.

Análisis estadístico

La lectura de los halos de inhibición formados (en milímetros) se reportó en tablas y/o gráficas, y se aplicó un análisis de varianza de doble vía (ANOVA), con un nivel de confianza del 95% (Morton *et al.*, 1993).

RESULTADOS

El análisis de 21 cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas de 3 piscinas del balneario “Aguas de Moisés”, Cariaco, Municipio Ribero, estado Sucre, demostró la presencia de 17 productoras del efecto antagónico frente bacterias indicadoras (*E. coli* K12 CVCM 178, *P. aeruginosa* CVCM 787, *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 636). En la tabla 1, se muestran las especies productoras, encontrándose en predominio *P. aeruginosa*, con 41,2%, seguido de *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas mendocina*, con 29,4%; 23,5% y 5,9%, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas*, productoras de efecto antagónico, aislados de 3 piscinas del balneario “Aguas de Moisés”, Cariaco, Municipio Ribero, estado sucre.

Especie	Nº de cepas productoras de efecto antagónico	%
<i>P. aeruginosa</i>	7	41,2
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	5	29,4
<i>P. stutzeri</i>	4	23,5
<i>P. mendocina</i>	1	5,9
total	17	100

%; porcentaje de predominio entre especies de *Pseudomonas* encontradas.

En la tabla 2 se muestra el efecto antagónico producido por cepas de *P. aeruginosa* provenientes de 3 pozas de “Aguas de Moisés”, crecidas en tripticasa de soya, sin azúcar añadido, contra cepas indicadoras del CVCM mediante los métodos de difusión de discos en agar y doble capa, al cabo de 24 horas de incubación, evidenciándose inhibición en las cepas: *S. aureus* CVCM 636, *B. subtilis* CVCM 591 y *E. coli* K12 CVCM 178, en ambos métodos. Así mismo, en el método de difusión de discos en agar se observa un efecto antagónico por *P. aeruginosa* contra cepas de su misma especie, con un halo promedio de inhibición de 9,6 mm de diámetro, a diferencia del método de

doble capa, donde no se produjo inhibición de la misma.

Tabla 2. Efecto antagónico producido por cepas de *P. aeruginosa* provenientes de 3 pozas del balneario “Aguas de Moisés”, Cariaco, Municipio Ribero, estado Sucre., crecidas en medio con tripticasa de soya, sin azúcar añadido, contra cuatro cepas indicadoras del centro venezolano de colecciones de microorganismos, a través de los métodos doble capa y difusión de discos en agar.

Métodos empleados				
Difusión de discos en agar			Doble capa	
Cepas Indicadoras	Nº de cepas Productoras (mm)	Promedios de inhibición	Nº de cepas productoras	Promedios de inhibición (mm)
<i>S. aureus</i>	7	19,3	7	19,0
<i>B. subtilis</i>	7	14,9	5	20,4
<i>P. aeruginosa</i>	2	9,6	0	0,0
<i>E. coli</i>	3	9,8	2	20,5

Nº: número.

La tabla 3 muestra el efecto antagónico producido por las cepas de *Pseudomonas* spp. provenientes de 3 pozas del balneario “Aguas de Moisés”, crecidas en tripticasa de soya, sin azúcar añadido al cabo de 24 horas de incubación, contra cepas indicadoras del CVCM, mediante los métodos de difusión de discos en agar y doble capa. En ambos métodos se observó actividad antagónica por cepas productoras en estudio contra *S. aureus* y *B. subtilis*. Así mismo, por el método de difusión de discos en agar, se evidencia un efecto inhibitorio de *Pseudomonas* spp. contra cepas de su mismo género con un halo promedio de 21,7 mm de diámetro, a diferencia del método de doble capa, donde no se produjo la inhibición de la misma. Además, se aprecia que no hubo inhibición de las cepas de *E. coli* en ambos métodos.

En la figura 1 se muestra el efecto antagónico de cepas de *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas*, crecidas en diferentes sustratos, contra cepas indicadoras provenientes del CVCM en relación al tiempo y a la fase de crecimiento, aplicando el método de difusión de discos en agar. Se observó que a medida que transcurrían las horas de crecimiento bacteriano de las cepas productoras de antagonismo, enfrentadas con las cepas indicadoras, el diámetro de los halos de inhibición aumentaba. La actividad

antagónica de *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* crecidas en el medio con glucosa contra *S. aureus* CVCM 636, se observó a partir de las 6 horas de incubación. De igual forma, se evidenció un efecto antagónico de las mismas, crecidas en los medios con manitol o maltosa, contra cepas de su mismo género a partir de las 12 horas.

En el caso de *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 636, se observó una inhibición por cepas de *Pseudomonas* de distintas especies incluyendo *P. aeruginosa*, crecidas en los distintos sustratos utilizados a partir de las 12 horas de incubación. La inhibición producida por estas especies de *Pseudomonas* crecidas en medios con distintos sustratos añadidos (glucosa, sacarosa, manitol ó maltosa) contra *E. coli* K12 CVCM 178 se observó al cabo de 24 horas de incubación. En el apéndice 3 se aprecia el efecto antagónico de la cepa *P. aeruginosa* crecida en medios con diferentes sustratos contra *S. aureus* CVCM 636, respectivamente, en relación al tiempo y a la fase de crecimiento a través del método de difusión de discos en agar.

Tabla 3. Efecto antagónico producido por cepas de *Pseudomonas* spp. provenientes de 3 pozas del balneario “Aguas de Moisés”, Cariaco, municipio Ribero, estado sucre., crecidas en tripticasa de soya, sin azúcar añadido, contra cepas indicadoras del centro venezolano de colecciones de microorganismos, a través de los métodos doble capa y difusión de discos en agar.

Cepas Indicadoras	Métodos empleados			
	Difusión de discos en agar		Doble capa	
	Nº de cepas Productoras (mm)	Promedios de inhibición	Nº de cepas Productoras (mm)	Promedios de inhibición
<i>S. aureus</i>	7	15,9	7	19,3
<i>B. subtilis</i>	5	10,6	5	15,3
<i>P. aeruginosa</i>	4	21,7	0	0,0
<i>E. coli</i>	0	0,0	0	0,0

Nº: número.

En la figura 2 se muestran los diámetros promedios de las cepas de *P. aeruginosa* sembradas en medios con diferentes sustratos, enfrentadas a 4 cepas indicadoras, determinado por el método de doble capa al cabo de 24 horas de incubación. Observándose un efecto inhibitorio contra *E. coli* en los medios que contenían glucosa,

sacarosa o manitol con halos promedios de 28,0; 26,0 y 20,0 mm, respectivamente.

Del mismo modo, se evidenció el crecimiento de *P. aeruginosa* crecidas en el medio con

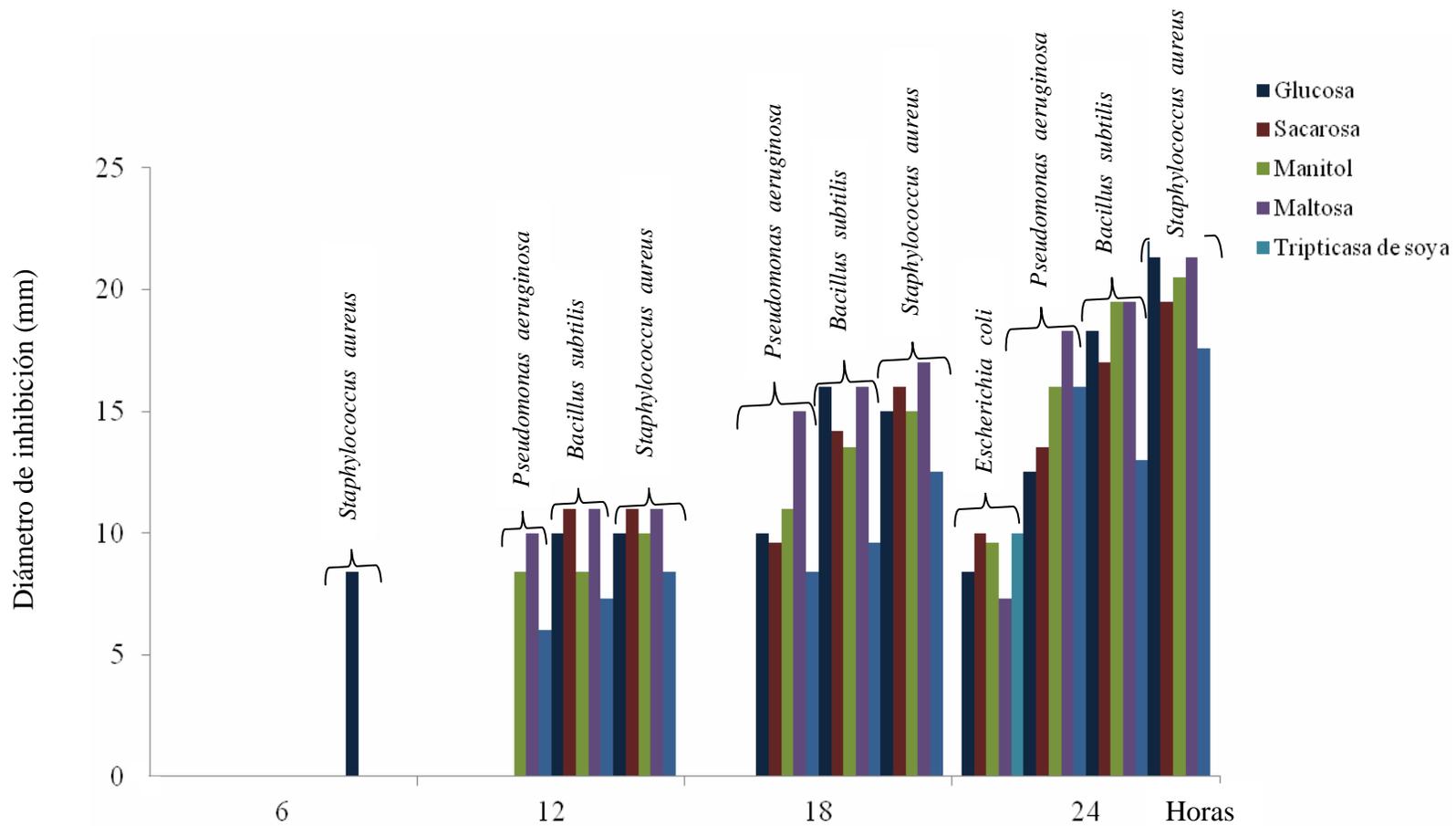


Figura 1. Efecto antagónico de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* crecidas en diferentes sustratos contra cuatro cepas provenientes del centro venezolano de colecciones de microorganismos en relación al tiempo y a la fase de crecimiento, a través del método de difusión de discos en agar.

sacarosa, observándose un efecto antagónico con un halo promedio de 20,0 mm contra cepas de su misma especie. Se demostró que estas cepas de *P. aeruginosa* crecidas en los medios con glucosa, sacarosa, manitol ó maltosa, produjeron un efecto inhibitorio contra *B. subtilis*, con halos promedios de 33,0; 27,0; 23,3 y 22,5 mm, respectivamente. En el caso de *S. aureus*, se observó una inhibición por las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en los medios con glucosa, maltosa, manitol ó sacarosa, con halos promedios de 32,0; 30,5; 24,0 y 22,5 mm, respectivamente.

La figura 3 muestra los diámetros promedios producidos por cepas de *Pseudomonas* spp. sembradas en medios con distintos sustratos al cabo de 24 horas de incubación, enfrentadas a cepas indicadoras, a través del método de doble capa; evidenciándose un efecto inhibitorio por las mismas contra *E. coli*, en los medios con maltosa, sacarosa, glucosa o manitol con diámetros promedios en sus halos de 25,0; 25,0; 24,3 y 19,5 mm, respectivamente. Así mismo, se aprecia una inhibición por cepas de *Pseudomonas* contra cepas de su mismo género (*P. aeruginosa*), en los medios con manitol, sacarosa o maltosa con halos promedios 27,3; 21,3 y 19,0 mm, respectivamente.

La inhibición producida por *Pseudomonas* spp. crecidas en los medios con glucosa, sacarosa, manitol o maltosa contra cepas de *B. subtilis*, se evidenció con diámetros promedios en sus halos de 21,6; 21,0; 20,2 y 19,5 mm, respectivamente. La actividad antagónica causada por *Pseudomonas* spp. crecidas en los medios con glucosa, maltosa, manitol o sacarosa contra *S. aureus*, produjo una inhibición con halos promedios de 25,0; 24,0; 20,7 y 20,0 mm, respectivamente.

A través de un análisis de varianza se determinó la comparación de 2 métodos para evaluar el efecto antagónico de cepas de *Pseudomonas* spp., de acuerdo al sustrato empleado. La prueba *a posteriori* LSD (95%) mostró la formación de 2 grupos independientes. El primer grupo con valores bajos constituido por el método 1 (difusión de disco en agar), y el segundo con el máximo promedio formado por el método 2 (doble capa).

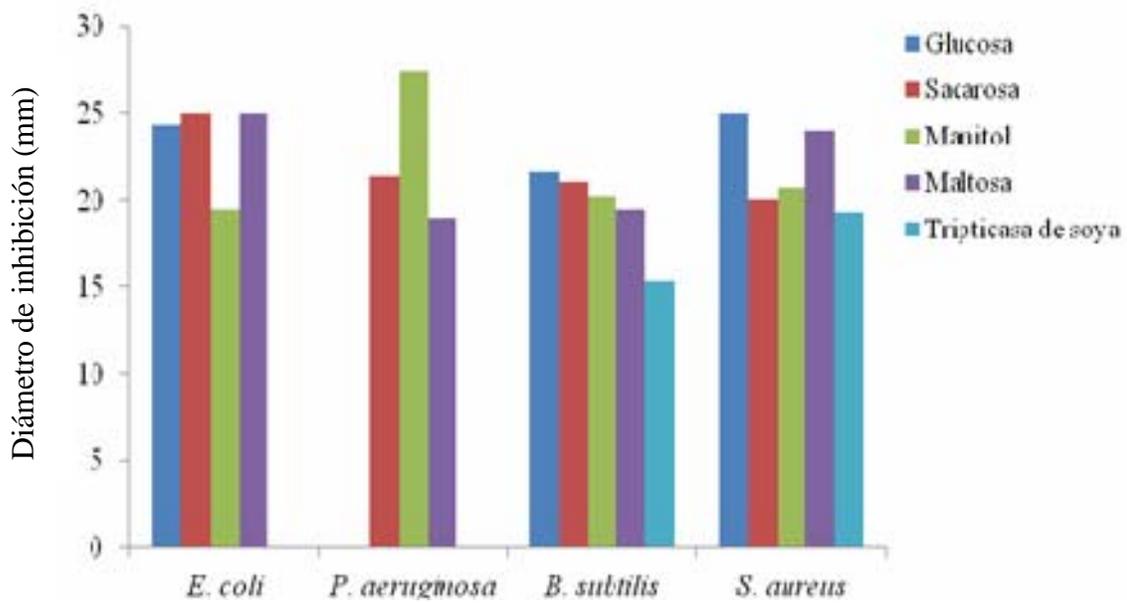


Figura 2. Diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por *Pseudomonas aeruginosa* crecidas en diferentes sustratos, frente a diferentes bacterias indicadoras, mediante el método de doble capa con 24 horas de incubación.

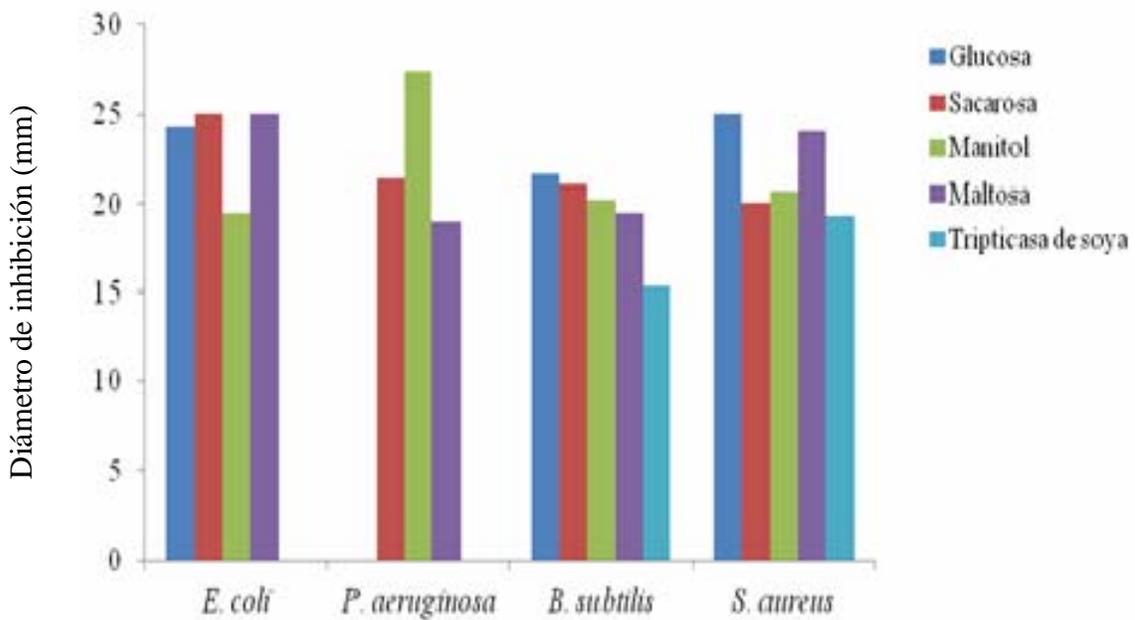


Figura 3. Diámetros promedio (mm) de los halos de inhibición producidos por cepas de *Pseudomonas* spp. crecidas en medios con diferentes sustratos, frente a diferentes bacterias indicadoras, mediante el método de doble capa al cabo de 24 horas de incubación.

En el anexo 1 se muestra el análisis de varianza de doble vía (ANOVA) de la cepas de *E. coli* K12 CVCM 178 inhibida por *Pseudomonas* spp., observándose una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ambos métodos, encontrándose una mayor cantidad de datos acumulados en el método de doble capa, con una media de 8,6 mm de diámetro.

En el anexo 2 se muestra el análisis de varianza de doble vía de las cepas de *P. aeruginosa* CVCM 787 inhibida por *Pseudomonas* spp., observándose en el método de doble capa halos de mayor diámetro con respecto al método de difusión de discos en agar; sin embargo, entre ambos no existen diferencias significativa ($p > 0,05$).

El anexo 3 muestra el análisis de varianza de doble vía (ANOVA) de la cepa de *B. subtilis* CVCM 591 inhibida por *Pseudomonas* spp., observándose una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ambos métodos, evidenciándose en el método de doble capa mayor efecto antagónico, con una media de halos inhibitorios de 18 mm de diámetro, con respecto al método de difusión de discos en agar.

En el anexo 4 se muestra el análisis de varianza de doble vía (ANOVA) de la cepa de *S. aureus* CVCM 636 inhibida por *Pseudomonas* spp., con una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ambos métodos, observándose una mayor inhibición de esta cepa indicadora a través de método de doble capa, evidenciándose una mayor cantidad de datos acumulados en una media de 18 mm de diámetro con respecto al método de difusión de discos en agar.

Las cepas de *Pseudomonas* spp., crecidas en el medio que contenía glucosa añadida, presentaron mayor efecto antagónico contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*. En el caso de *Pseudomonas* spp. crecidas en medio con sacarosa añadida sólo hubo inhibición contra cepas de su mismo género, sin embargo, de acuerdo a los distintos sustratos empleados en ambos métodos no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Las cepas de *Pseudomonas* crecidas en medios con distintos sustratos y en el medio tripticasa de soya, sin azúcar, son productoras del efecto antagónico contra cepas de su mismo género e incluso de otras especies bacterianas (*E. coli* K12 CVCM 178, *P. aeruginosa* CVCM 787, *B. subtilis* CVCM 591, *S. aureus* CVCM 636), utilizando métodos distintos, lo que corrobora resultados obtenidos por otros autores que coinciden con el efecto antagónico de cepas de *Pseudomonas* spp. asociadas a suelos, aguas y de origen clínico (Araque *et al.*, 2007; Morales, 2009; Parra, 2009; Barrios, 2010).

El método de difusión discos en agar, se evaluó con el fin de determinar el tiempo en el que se produce el efecto antagónico en relación a la fase de crecimiento de *Pseudomonas* spp., observándose que a medida que transcurrían las distintas horas de incubación del crecimiento bacteriano los halos de inhibición aumentaban de tamaño, evidenciándose que a las 24 horas de incubación, las células bacterianas entran en una fase estacionaria donde no hay crecimiento de la cepa en estudio, pero se obtuvo una mayor actividad antagónica por las cepas de *Pseudomonas* spp. contra distintas especies bacterianas.

Santoyo *et al.* (2010) determinaron que la síntesis de los compuestos como los sideroforos y sustancias antibióticas, son sintetizadas, principalmente, en etapas exponenciales de crecimiento, siendo la fase donde la población requiere más nutrientes para la división celular. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo de incubación, se incrementa su concentración hasta las 22 a 24 horas, donde se observa que comienza a disminuir la producción de los mismos, debido, presumiblemente, a la liberación de enzimas intracelulares y donde se activa la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, en el metabolismo antioxidante y en el transporte de nutrientes (Hecker y Völker, 2001).

Una característica del crecimiento exponencial es que la velocidad del aumento del número de células es inicialmente lenta, pero se incrementa cada vez más con el tiempo. En general, las células en crecimiento exponencial están en un estado fisiológico más sano y, por ello, las células tomadas en un punto medio exponencial son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y bioquímicos. Sin embargo, la velocidad de crecimiento está influenciada por las condiciones ambientales (temperatura y composición del medio, entre otros). Luego del crecimiento exponencial, viene la fase estacionaria, donde no hay aumento ni descenso neto en el número de células y aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos (Madigan *et al.*, 2004).

Ambos métodos utilizados, difusión de discos de papel filtro en agar y doble capa, poseen procedimientos metodológicos distintos, y permitieron comprobar el efecto antagónico de las cepas estudiadas. A través de los resultados obtenidos con el método de doble capa, se observó un mayor efecto antagónico por las distintas especies de *Pseudomonas* contra las bacterias indicadoras, evidenciándose, un mayor diámetro en sus halos de inhibición, con respecto, a los obtenidos en el método de difusión de discos de papel filtro en agar que fueron de menor diámetro, lo cual pudo deberse a que en el método de doble capa se utilizó una suspensión de cultivo puro de la cepa en estudio, donde pudieran estar involucrados diferentes metabolitos antibacterianos logrando una mayor difusión de la sustancia antagónica en el medio de cultivo, a diferencia del método de difusión de discos de papel filtro en agar, donde se utilizó el sobrenadante que pudiera contener proteínas y moléculas que no logran la mayor adherencia de la sustancia antibacteriana al mismo.

En cuanto a la técnica de extracción empleada en el método de difusión de discos en agar, se obtuvo una sustancia acuosa a partir de cepas de *Pseudomonas* spp. que produjeron inhibición de distintas cepas bacterianas. El resultado hallado en el presente

estudio se debe a la producción de bacteriocinas u otro tipo de sustancias antibacterianas extraídas de estas cepas, capaces de inhibir o producir la muerte de cepas indicadoras presentes en el medio. En el mismo contexto, González (2007) evidenció actividad antibacteriana empleando el extracto acuoso del caracol manzana *Pomaca glauca*, el cual produjo una inhibición de distintas cepas bacterianas (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*).

Los resultados en este estudio ponen evidencia que los metabolitos activos (bacteriocinas y sideróforos) de origen bacteriano desempeñan una función vital en las interacciones microbianas. Por su parte, Fernández (2001) y Muñoz (2003), señalaron que los antagonistas no tienen un único modo de acción y que la producción de sustancias tipo antibiótico es el resultado de la respuesta del sistema de defensa de la bacteria, la cual puede depender, principalmente, de las condiciones cambiantes del medio (temperatura, pH, composición del medio) donde se encuentren y no es fácil determinar con precisión los factores que intervienen en las interacciones antagónicas.

Por su parte, Morales (2009) observó efecto antagónico en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de coprocultivos de niños menores de 5 años en el estado Sucre, en donde tres cepas produjeron actividad antagónica contra *P. aeruginosa* CVC 787, dos cepas contra *E. coli* K12 CVC 131 y una cepa contra *B. subtilis* CVC 591, mientras que ningún aislado inhibió a *S. aureus* CVC 636, este estudio difiere de los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se evidenció mayor efecto antagónico por parte de *P. aeruginosa* contra cepas Gram negativas más que en las Gram positivas. Es importante mencionar que las cepas bacterianas aisladas, productoras del efecto antagónico, en ambos estudios tienen procedencia distinta. Las cepas obtenidas por Morales (2009) son de muestras intrahospitalarias y las utilizadas en este estudio son de muestras ambientales, la cual pudieran justificar o explicar en parte el comportamiento distinto.

Barrios (2010) determinó la presencia de sustancias extracelulares antagónicas en 10 cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas de la cuenca del río Manzanares, obteniéndose tres

que produjeron actividad antagónica contra *P. aeruginosa* CVCM 787 y *E. coli* K12 CVCM 131 y las otras siete contra *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 636. Estudio similar a lo planteado en este trabajo, ya que en ambos hubo mayor inhibición de los géneros bacterianos Gram positivos, además, la procedencia de las muestras empleadas es ambiental.

Las cepas de *Pseudomonas* produjeron un mayor efecto antagónico sobre las bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*), con respecto, a las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*), estos resultados se evidenciaron en ambos métodos, la cual, pudiera deberse al mecanismo de acción de las cepas bacterianas antagónicas y a la estructura celular de las cepas indicadoras, entre los que cabe mencionar: bloqueos metabólicos, formación de poros en la membrana celular y cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Las bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de utilizar un mecanismo directo para inhibir a otras especies bacterianas, que consta de la unión electrostática de las cepas antagónicas capaz de producir péptidos catiónicos que son atraídos a la superficie microbiana que presenta carga negativa, por ejemplo, los fosfolípidos ácidos, en bacterias Gram negativas, y ácidos teicoicos en bacterias Gram positivas, estos péptidos producidos por las cepas antagónicas entran en contacto con la superficie de la célula bacteriana (cepa indicadora), donde atraviesan el polisacárido capsular, y posteriormente interactúan con la bicapa lipídica, alterando la permeabilidad de la membrana y provocando la lisis celular a través de los poros (Montano y Vargas, 2001).

Padilla *et al.* (2002) estudiaron la estructura de la membrana plasmática de las cepas bacterianas sensibles a sustancias antibacterianas producidas por el género *Pseudomonas*, las cuales poseen en su superficie receptores que son bioquímicamente reconocidos por esta cepa. Las bacterias del género *Pseudomonas* ejercen actividad letal de absorción sobre los receptores específicos en la superficie externa de las cepas sensibles y luego, son capaces de interactuar con la membrana citoplasmática, conduciendo a la muerte bacteriana.

Las cepas de *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* crecidas en un medio con glucosa añadida como única fuente de carbono produjeron un mayor efecto antagónico, con respecto a las cepas productoras, cultivadas en medios que contenían otros sustratos (sacarosa, manitol ó maltosa) e incluso en el medio donde no se incorporó azúcar. Sin embargo, al sembrar *Pseudomonas* productoras de actividad antagónica en los medios con distintos sustratos (glucosa, sacarosa, manitol ó maltosa), fueron capaces de desarrollarse e inhibir a diferentes géneros bacterianos, incluyendo a cepas de su mismo género. Al respecto, Infante *et al.* (2009) demostraron que cuando existe la adición de un sustrato tipo carbohidrato, a partir del cual las células bacterianas obtienen carbono y energía, se reactiva el metabolismo produciendo un incremento poblacional de las cepas productoras de antagonismo, y al colocarlas en contacto con otras cepas bacterianas de igual o distintos géneros bacterianos, producen sustancias antagónicas para inhibir o matar, bien sea por espacio o alimento. La glucosa es conocida como el sustrato más simple de la naturaleza y, por ello, es el más utilizado por las bacterias incluyendo *Pseudomonas* spp. para producir sustancias antimicrobianas, provocando la inhibición de distintas cepas bacterianas (Varela y Grotiuz, 2008).

Pseudomonas es una bacteria nutricionalmente versátil debido a la capacidad de utilizar como fuente de carbono una gran variedad de carbohidratos que los utiliza para la síntesis y el metabolismo bacteriano, esto se traduce en la capacidad que tiene *Pseudomonas* de utilizar una amplia variedad de sustratos a través de la producción de metabolitos secundarios, como sideróforos y antibióticos (Li *et al.*, 2008). Estos metabolitos (bacteriocinas, sideróforos, entre otros), son producidos durante la fase estacionaria de crecimiento microbiano y su producción depende de las condiciones de cultivo, siendo los parámetros nutricionales de gran importancia, reconociéndolos como la clave para incrementar los niveles de producción de los metabolitos (Frías *et al.*, 2007).

Al respecto, estudios relacionados con la actividad antagónica se han desarrollado en la

actualidad, Parra (2009) determinó en cepas de *Burkholderia cepacia* aislada de rizósfera de maíz, la actividad antifúngica de la especie bacteriana frente a *Trichoderma viride* en medios que contenían xilosa ó trehalosa como única fuente de carbono, demostrando la capacidad de la bacteria de inhibir el crecimiento de hongos en presencia de ambos carbohidratos como única fuente de carbono y nitrógeno.

El análisis estadístico planteado mostró una diferencia significativa ($p < 0,05$) de acuerdo a los métodos empleados, observándose en el método de doble capa un mayor diámetro en sus halos con respecto a los obtenidos con el método de difusión de discos en agar, y aunque no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en los diferentes sustratos empleados en ambos métodos, se evidenció que *Pseudomonas* spp. crecida en el medio con glucosa produjo mayor actividad antagónica contra las distintas especies indicadoras. Estos resultados corroboran que la sustancia antimicrobiana extraída de *Pseudomonas* en el método de doble capa, tuvo mejor difusión en el medio de cultivo, provocando mayor inhibición de las cepas indicadoras.

CONCLUSIONES

Se identificaron 21 aislados de *Pseudomonas* spp. provenientes del balneario “Aguas de Moisés”, municipio Ribero, estado sucre, donde 17 cepas fueron productoras de efecto antagónico contra bacterias indicadoras Gram positivas y Gram negativas.

El método de doble capa permitió evidenciar un mayor efecto antagónico en cepas de *Pseudomonas* spp., contra *E. coli* K12 CVCM 178, *P. aeruginosa* CVCM 787, *B. subtilis* CVCM 591, *S. aureus* CVCM 636.

El sustrato glucosa añadido en el medio tripticasa de soya indujo mayor efecto antagónico en las diferentes especies de *Pseudomonas* ante las cepas indicadoras con respecto a sacarosa, manitol y maltosa.

El mayor efecto antagónico de las cepas de *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* ocurrió en la fase estacionaria.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios que permitan caracterizar metabolitos u otras sustancias extracelulares en las cepas de *Pseudomonas* sp., a las cuales se les determinó el efecto antagónico, para garantizar su empleo como agentes de biocontrol y, de este modo, contribuir al mantenimiento de estas aguas y sedimentos mineromedicinales.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, J. 2001. *Pseudomonas fluorescens*. *Ithaca*, 607: 255-256.
- Araque, Y.; Albarado, L.; Centeno, S.; Rodríguez-Lemoine, V. y Vitelli, J. 2007. Actividad antibiótica y antifúngica de *B. cepacia* provenientes de ambientes nosocomiales. Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”. Cumaná-Venezuela. *Kasmera*, 35(2): 107-117.
- Arquéz, J. 2003. Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. Trabajo Doctoral. Departamento de nutrición y bromatología III, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Barrios, J. 2010. Antagonismo de sustancias extracelulares de aislados de *Pseudomonas* sp. provenientes de la cuenca del río Manzanares. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Broocks, G.; Butel, J. y Morse, S. 2001. *Microbiología médica*. Décimo séptima edición. Editorial el manual moderno S.A. Estado de México.
- Chaves, N. 2007. “Utilización de bacterias y hongos endofílicos para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* (cobb) Thom”. <<http://bioversity.catie.ac.cr/calidadsuelos/docs/tesis/a1654E.pdf>> (01/06/2009).
- Cintas, L.; Casaus, M.; Herranz, C.; Nes, I. y Hernández, P. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food science technology international*, 7(4): 281-305.
- Cornelis, P. 2008. *Pseudomonas: Genomics and molecular biology*. One Edition. *Caister Academic Press*, 19(6): 978.
- Dopazo, M.; Lemus, J.; Barja, J. y Toranzo, A. 1998. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of applied microbiology*, 65: 97-101.
- Esnard, S. y Díaz, O. 1997. Identificación y caracterización de los bacilos gramnegativos no fermentadores en el medio hospitalario. *Revista cubana de higiene y epidemiología*, 35(1): 30-37.
- Fernández, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Avances en el fomento de productos fitosanitarios no- sintéticos*, 62: 96-100.
- Ferrera, R.; Rojas, N.; Poggi, H.; Alarcón, A. y Cañizares, R. 2006. Processes of bioremediation of soil and water which were contaminated by oil hydrocarbons and

- other organic substances. *Reviews latin american microbiology*, 48: 179-187.
- Frías, A.; Villa, P. y Torres, E. 2007. Metabolitos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS: influencia de la fuente de carbono en la síntesis. *Biology technology*, 11(1): 42-47.
- Gómez, S.; Gutiérrez, D.; Hernández, A.; Hernández, C.; Lozada, M. y Mantilla, P. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA-publicación científica en ciencias biomédicas*, 6(9): 101-212.
- González, B.; Gómez, M. y Jiménez, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista salud y nutrición*, 4(2): 1-11.
- González, G. 2007. Bioactividad de los extractos acuosos provenientes del caracol manzana *Pomaca glauca* (gasterópoda ampullaridae). Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Hass, D. y Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature reviews microbiology*, 3(4): 307-319.
- Hecker, M. y Völker, U. 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in microbial physiology*, 44: 35-91.
- Hucker, G. y Conn, H. 1923. Methods for gramstainig. *Technique bulletin*, 93(5): 1-37.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 1(24).
- Koneman, E.; Allen, S.; Procop, G.; Jonda, W.; Schreckemberger, P.; Goods, G.; y Winn, W. 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Editorial médica Panamericana. México, DF.
- Lewus, C. y Montville, T. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of microbiological methods*, 13: 145-150.
- Li, X., Quan, C., Yu, H., Fan, S. 2008. Multiple effects of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against *Candida albicans*. *FEMS microbiology lett.*, 85: 250-256.
- Mac Faddin, J. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Quinta Edición. Editorial panamericana. Buenos Aires.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2004. *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima edición. Editorial pearson educación, S.A. Madrid.
- Malbrán, C. 2001. "Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a

- los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos”.<http://cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/ArgentinaLevelII/manual_procedimientos.pdf> (19/05/201).
- Martínez, E. 2001. “Infecciones por *Pseudomonas*”. El nuevo Diario, 10 de Marzo 2001, Pág. 2.
- Meriño, L.; Hreñuk, G.; Alonso, J y Ranconi, M. 2000. “Dotación plasmídica y bacteriocinotipo en *Shigella* spp”. “Unne”.<http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicinas> (06/04/2011).
- Montano, K.; Vargas, F. 2001. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Revista Interciencia*, 1(27).
- Morales, Y. 2009. Actividad antagónica de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de coprocultivos de niños menores de 5 años. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Moreira, W. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Trabajo doctoral, facultad veterinaria. Universidad complutense de Madrid, España.
- Morton, R.; Helbel, J. y Mc Carter, R. 1993. *Bioestadística y epidemiología*. Tercera edición. Editorial Mac Graw Hill. México.
- Mosso, M.; De la Rosa, M.; Vivar, C.; Arroyo, G. y Díaz, F. 1994. “Diversidad microbiana de las aguas minero-medicinales del manantial del balneario de Lugo”. Real academia farmacia Madrid.<<http://agua.igme.es/igme/publica/pdf.art3/diversidad.pdf>> (19/03/08).
- Muñoz, J. 2003. “Bacteriocinas: una estrategia de competencia antimicrobiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano”. “Bioeslínea”. <<http://www.microbiología.org.mx/microbiosenlinea>> (02/04/2010).
- Murray, P.; Baron, E.; Pfaller, M.; Tenover, F. y Tenover, R. 1999. *Manual of clinical microbiology*. Séptima edición. Editorial Borrada. Washington, D.C.
- Ogunbanwo, S.; Sanni, A. y Onilude, A. 2003. Influence of cultura conditions on the production of bacteriocina by *Lactobacillus brevis* OG1. *Africans journal of biotechnology*, 2(7): 179-184.
- Padilla, C.; Lobos, O.; Brevis, P.; Abaca, P. y Hubert, E. 2002. Efectos del bacteriocin PsVP-10 producidos por *Pseudomonas* sp. sobre especies bacterianas sensibles. *Revista latinoamericana microbiología*, 44(1):19-23.

Pájaro, M.; Barbeis, I. y Albesa, I. 1995. *Pseudomonas fluorescens*: Producción de pioverdina en sangre humana a 4°C y efecto citotóxico del pigmento. *Revista latinoamericana de microbiología*, 37(1): 1-6.

Parra, E. 2009. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea maíz l.*) bajo diferentes condiciones de cultivo. Trabajo de grado. Departamento de biología. Universidad de Oriente. Cumaná.

Pellón, F.; Orozco, R. y León, J. 2001. Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aisladas de moluscos bivalvos en cultivos. *Revista peruana de biología*, 8(2): 25-32.

Pérez, C.; De la Fuente, L.; Árias, A. y Atier, N. 2001. Uso de *Pseudomonas fluorescens* nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus/corniculatus*. *Revista agrociencias*, 4(1): 41-47.

Pumarola, A.; Rodríguez, A.; García, J. y Piedrola, G. 1992. *Microbiología y parasitología médica*. Segunda edición. Ediciones Masson Salvat. Barcelona, España.

Rodríguez, M. 1997. Infecciones por *Pseudomonas* en una unidad de cuidados intensivos. *Revista de la asociación mexicana crítica y terapia intensiva*, 11(5): 136-140.

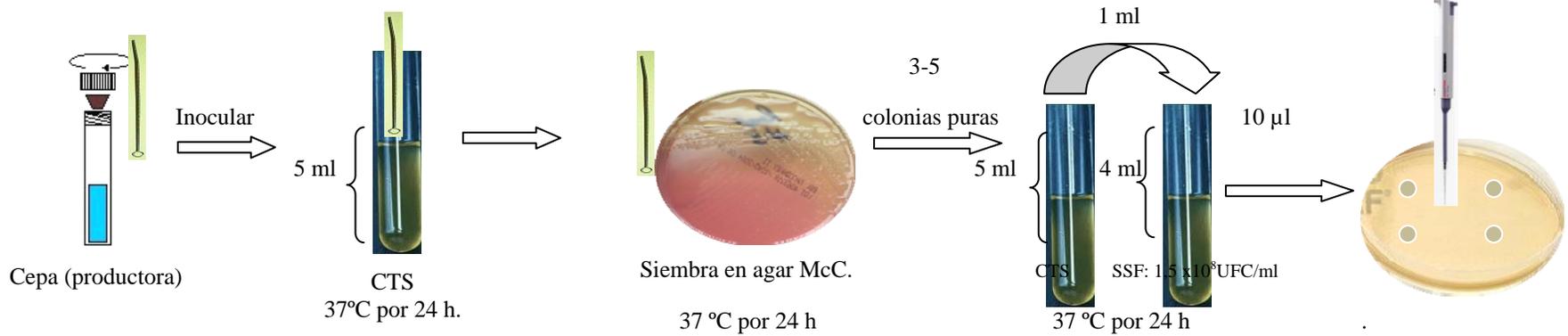
Santoyo, G.; Cantero, E.; Mosqueda, M.; Cabriales, J. y Rodríguez, A. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terralatinoamericana*, 1(28):55.

Varela, G. y Grotiuz, G. 2008. Fisiología y metabolismo bacteriano. <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/fisiologíaymetabolismobacteriano.pdf>> (05/03/2012).

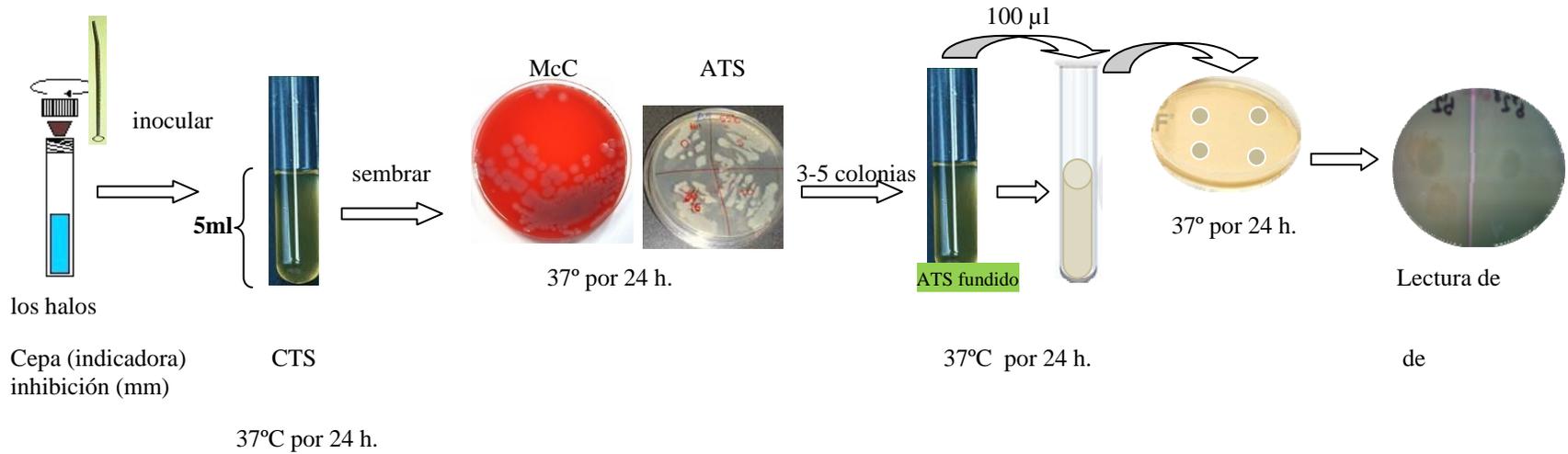
Vergara, E.; Largo, J. y Galván, F. 2007. “Ectima grangrenoso en niño sano sin septicemia”. *Colombia médica*, 38(4): 408-411.

APÉNDICE

APÉNDICE 1. MÉTODO DE DOBLE CAPA

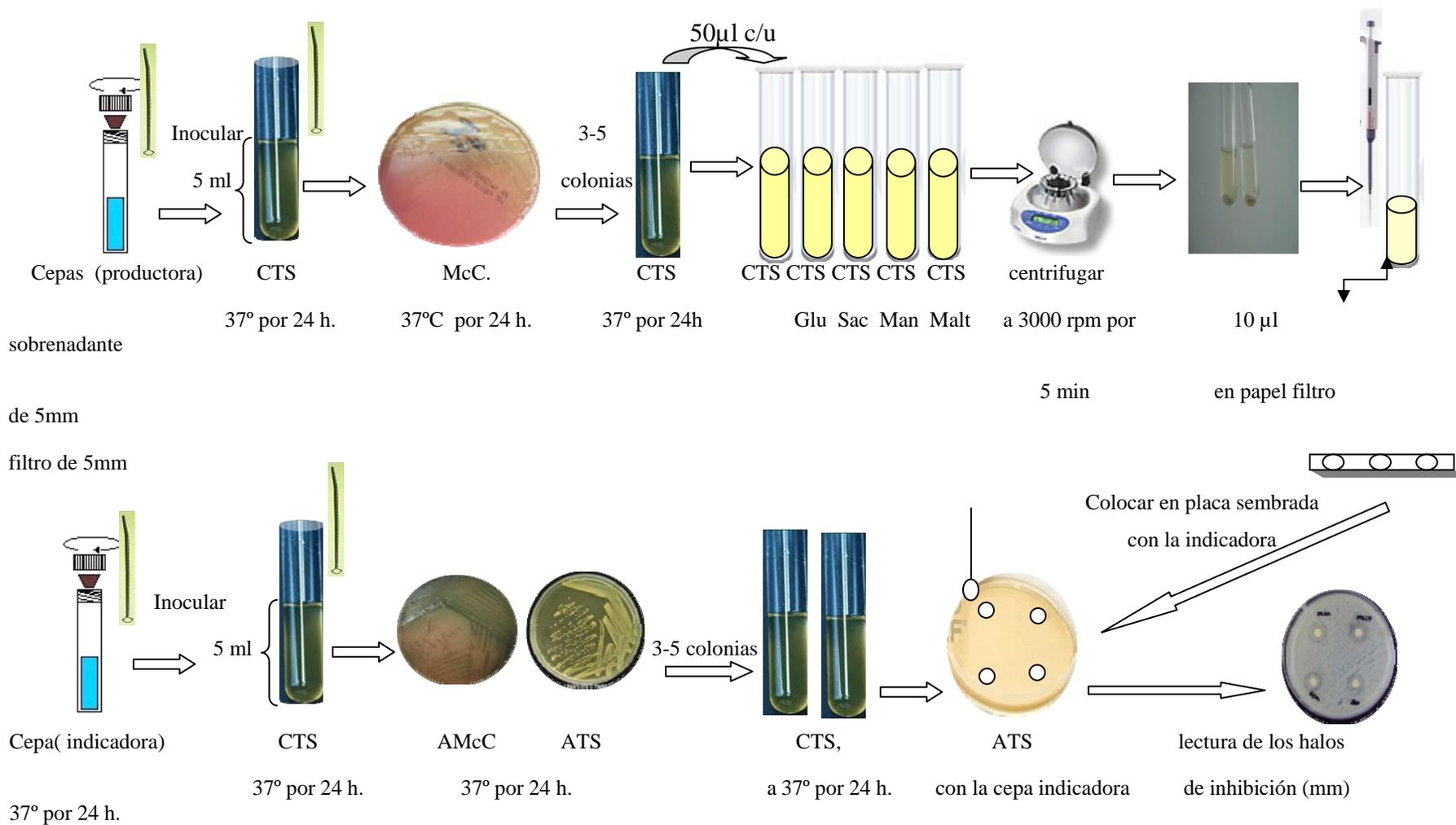


ATS

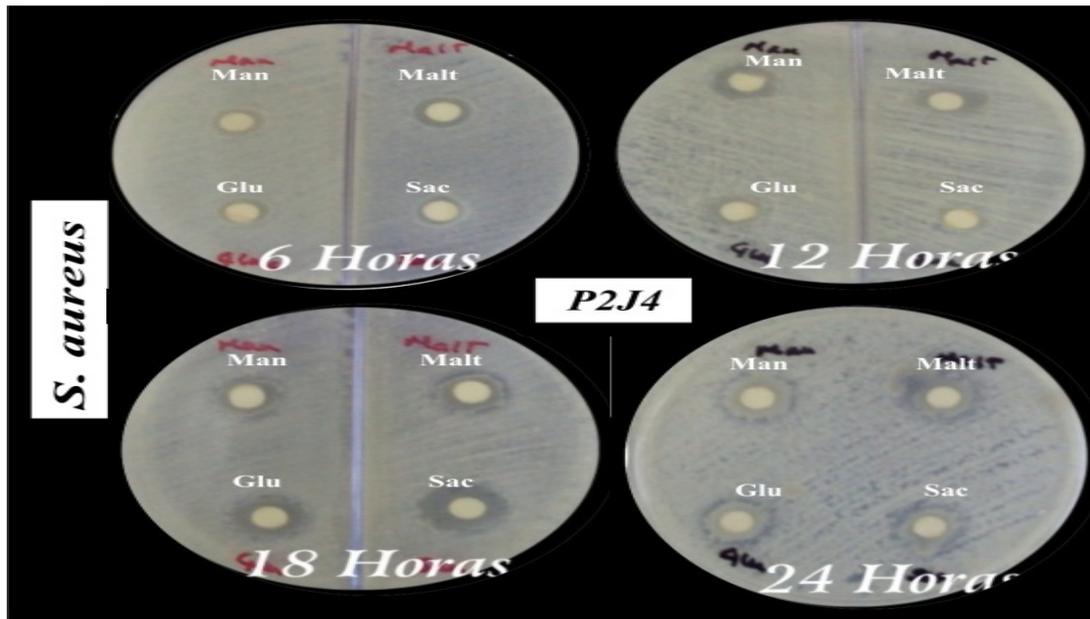


CTS: caldo tripticasa de soya; McC: MacConkey; ATS: agar tripticasa de soya; mm: milímetros.

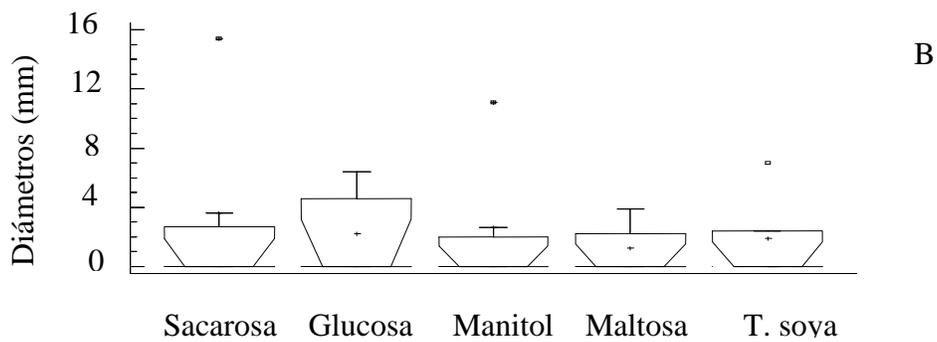
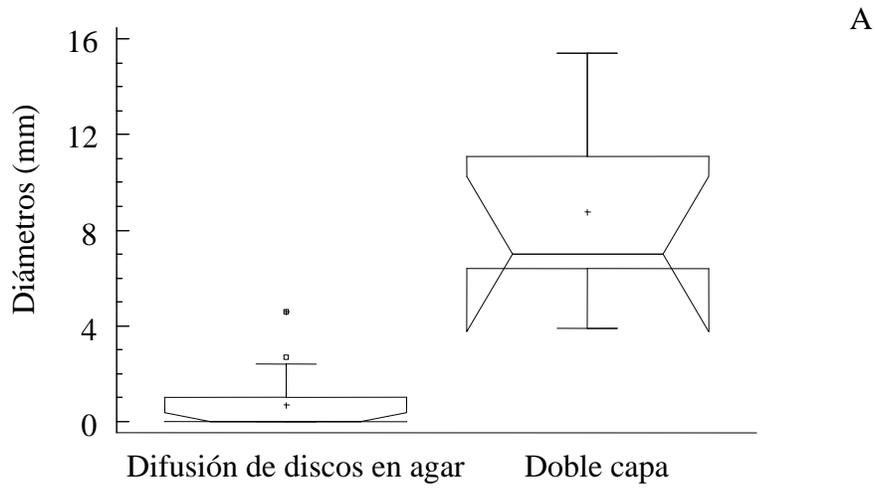
APÉNDICE 2. MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCOS EN AGAR



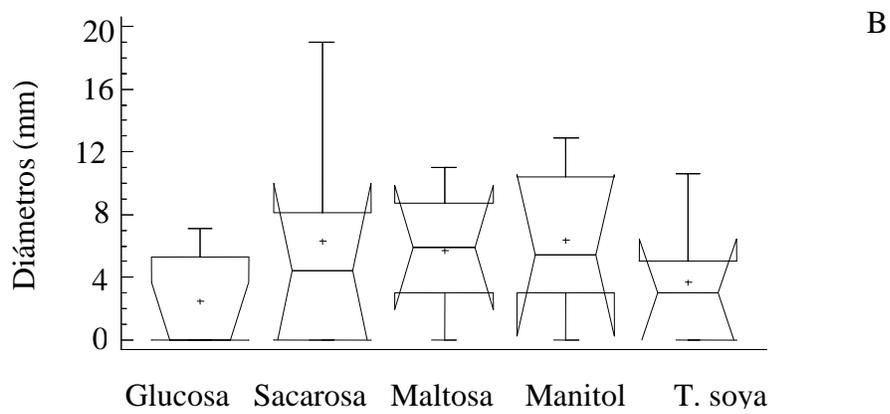
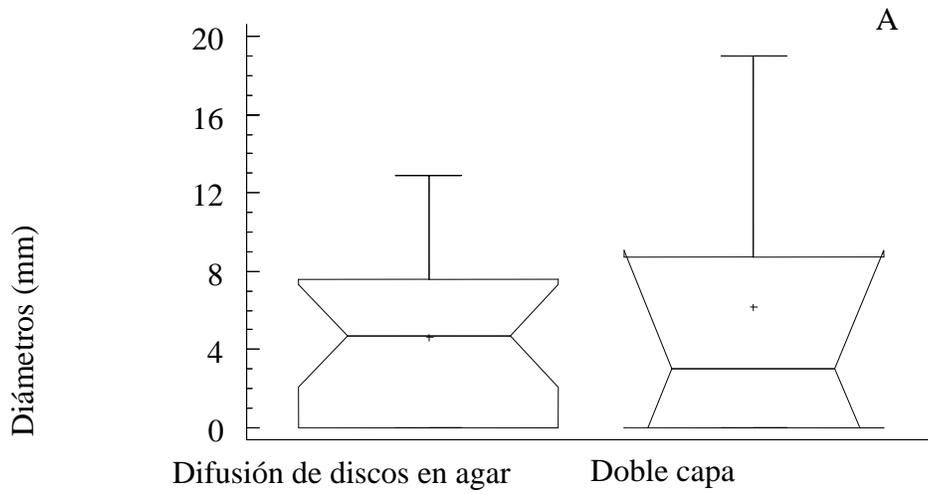
CTS: caldo tripticasa de soya; AMcC: agar MacConkey; ATS: agar tripticasa de soya.



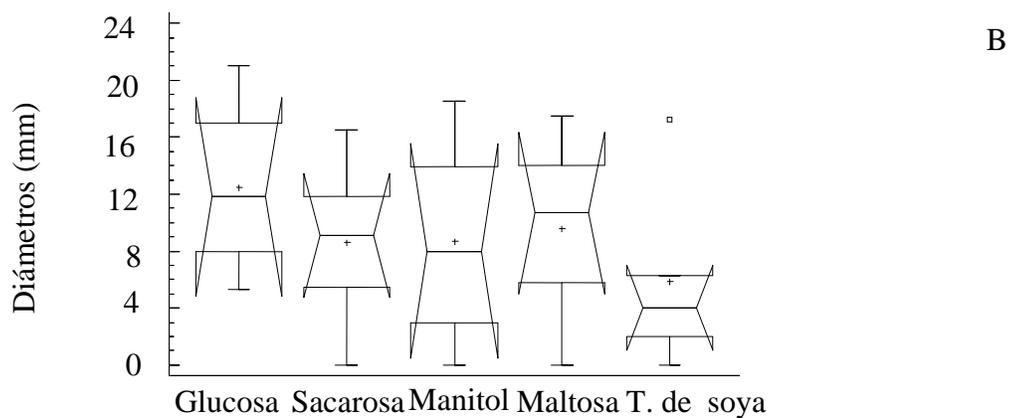
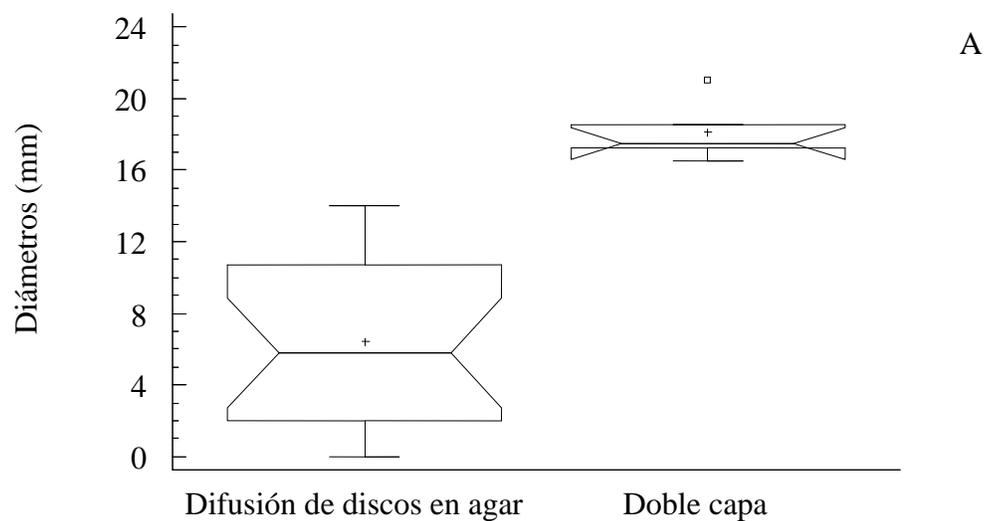
Apéndice 3. Efecto antagonístico del extracto acuoso de *Pseudomonas aeruginosa* (P₂J₄), crecidas previamente en diferentes sustratos, contra *S. aureus* CVCM 636 en relación a la fase de crecimiento, a través del método de difusión de discos en agar. Glu: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manitol; Malt: maltosa.



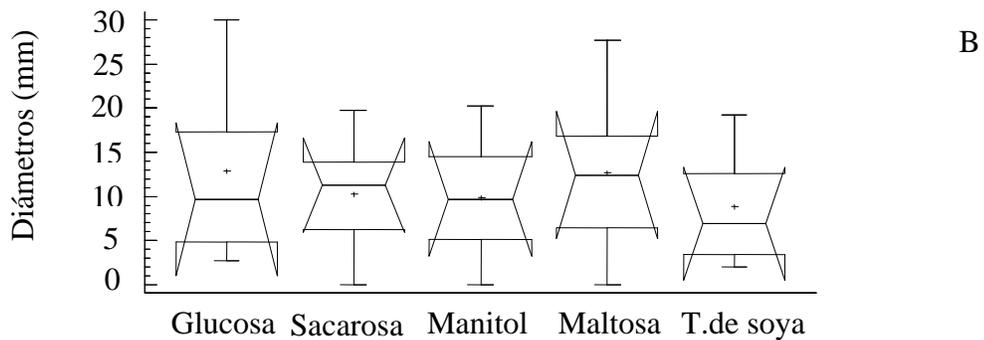
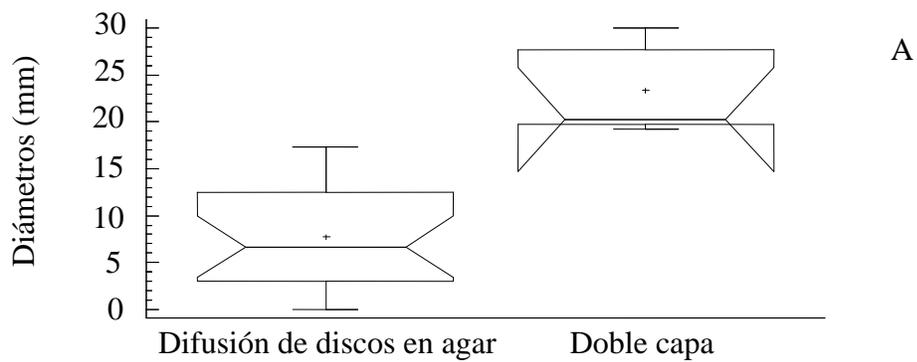
Anexo 1. Análisis estadístico de varianza de doble vía representado en gráfico de cajas y bigotes de la cepa *E. coli* K12 CVCM 178 inhibida por *Pseudomonas* spp., A) a través de 2 métodos empleados y B) crecidas en medios con diferentes sustrato añadidos.



Anexo 2. Análisis estadístico de varianza de doble vía representando en gráfico de cajas y bigotes de la cepa *P. aeruginosa* CVCM 787 inhibida por *Pseudomonas* spp., A) a través de 2 métodos empleados y B) crecidas en medios con diferentes sustrato añadidos.



Anexo 3. Análisis estadístico de varianza de doble vía representando en gráfico de cajas y bigotes de la cepa *B. subtilis* CVCM 591 inhibida por *Pseudomonas* spp., A) a través de 2 métodos empleados y B) crecidas en medios con diferentes sustrato añadidos.



Anexo 4. Análisis estadístico de varianza de doble vía representado en gráfico de cajas y bigotes de la cepa *S. aureus* CVCM 636 inhibida por *Pseudomonas* spp., A) a través de 2 métodos empleados y B) crecidas en medios con diferentes sustrato añadidos.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	EFEECTO ANTAGÓNICO DE <i>Pseudomonas</i> spp. AISLADAS DE LAS POZAS TERMALES “AGUAS DE MOISÉS”, CARIACO, MUNICIPIO RIBER ESTADO SUCRE
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Mosquera Guédez, Johana Alejandra	CVLAC	15.868.569
	e-mail	Johanita82ve@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Actividad antagónica.
Fase estacionaria.
<i>Pseudomonas</i> spp.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En el presente estudio se evaluó el efecto antagónico de 17 cepas del género *Pseudomonas*, aisladas de tres piscinas del balneario “Aguas de Moisés”, Municipio Ribero, estado Sucre, Venezuela, contra cuatro cepas indicadoras provenientes del centro venezolano de colecciones de microorganismos (CVCM) en distintos sustratos, también, se midió la acción de diferentes sustratos en la actividad inhibitoria, en relación a la fase de crecimiento de las cepas productoras a cuatro horas distintas de incubación (6,12,18 y 24). La determinación del efecto antagónico de dichas cepas se realizó mediante los métodos de difusión de discos en agar y doble capa. Se aplicó un análisis de varianza de doble vía (ANOVA) con un nivel de confianza de 95%. Las 17 cepas del género *Pseudomonas* mostraron actividad antagónica contra cepas indicadoras *Escherichia coli* K12 CVCM 178, *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 787, *Bacillus subtilis* CVCM 591 y *Staphylococcus aureus* CVCM 636. Los mayores halos de inhibición producidos por cepas de *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* fueron contra las cepas indicadoras *S. aureus* y *B. subtilis*. A través del método de doble capa, se evidenció un mayor efecto antagónico por el género *Pseudomonas* contra cepas de distintos géneros bacterianos, estas cepas de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* spp. produjeron un mayor efecto inhibitorio en los medios con glucosa añadida en relación a los demás sustratos empleados. La actividad antagónica se produjo mejor en la fase estacionaria de crecimiento, donde las cepas produjeron un mayor efecto antagónico contra las cepas indicadoras.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
Araque Yasmina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/>	A <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.000.717			
	e-mail	Yamasi40@gmail.com			
	e-mail				
Salazar Elsa	ROL	C <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10.460.717			
	e-mail	Elsazul2003@yahoo.es			
	e-mail				
Albarado Luzmila	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9.278.774			
	e-mail	luzalv@hotmail.com			
	e-mail				
Guzman Militza	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.954.225			
	e-mail	miltzaguz@yahoo.es			
	e-mail				

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	11	08

Lenguaje: SPA _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-MosqueraJ.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: _____ **(Opcional)**

Temporal: _____ **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo: _____ Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: _____ Licenciada

Área de Estudio: _____ Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: _____
Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA

RECIBIDO POR *[Firma]*

FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]
JUAN A. BOLANOS CUNTELO
Secretario



C.C.: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

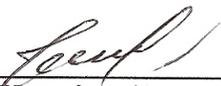
Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

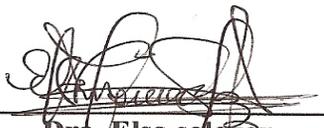
Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Johana Mosquera
Autor



Dra. Yasmina Araque
Asesora



Dra. Elsa Salazar
Coasesora