

## SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE *Pseudomonas* spp. AISLADAS DE SUELOS AGRÍCOLAS DEL ESTADO SUCRE, VENEZUELA

### ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY *in vitro* OF *Pseudomonas* SPP. ISOLATED FROM AGRICULTURAL SOILS OF SUCRE STATE, VENEZUELA

LUZMILA S. ALBARADO YSASIS, EVELIN FLORES FERNÁNDEZ, MILITZA GUZMÁN, ROSA MARTÍNEZ ALCALÁ, YASMINA ARAQUE CALDERÓN

*Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, E-mail: luzalv@hotmail.com*

#### RESUMEN

Se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana en *Pseudomonas* spp. aisladas en suelos de localidades agrícolas del estado Sucre, Venezuela. Se analizaron muestras de suelos bajo siete tipos de cultivo (naranja, yuca, lechosa, limón, plátano, cambur, piña y ciruela), en el periodo junio-agosto de 2006. Se determinó el pH, humedad, textura y conductividad eléctrica de cada muestra; para determinar el recuento de bacterias aerobias totales se aplicó el método de diluciones seriadas. La susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* y la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), se determinaron por el método de difusión en disco y sinergismo de doble disco. Los suelos bajo cultivo fueron neutros y alcalinos. Las muestras de suelo de lechosa y limón mostraron los recuentos más elevados con  $6,8 \times 10^{10}$  y  $8 \times 10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>. No hubo asociación entre el conteo bacteriano y pH. Las especies identificadas fueron *P. aeruginosa* (40%), *P. putida* (36%) y *P. mendocina* (24%). *Pseudomonas* spp. mostró 100% de sensibilidad a amikacina, meropenem, imipenem, ciprofloxacina, cefepima, piperacilina-tazobactam y ceftazidima, resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, aztreonam, ceftriaxona, ceftaxitina y cefotaxima, y ausencia de BLEE. Los aislados ambientales caracterizados como *Pseudomonas* spp. presentaron sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos ensayados, probablemente debido al poco uso de antibióticos en el mantenimiento de los cultivos agrícolas en la región.

**PALABRAS CLAVE:** *Pseudomonas* spp., susceptibilidad antimicrobiana, suelos alcalinos.

#### ABSTRACT

The antimicrobial susceptibility was evaluated in *Pseudomonas* spp. isolated from agricultural soils of the Sucre state, Venezuela. Samples from soils supporting seven crop types (orange, cassava, papaya, lemon, banana, pineapple and plum) were analyzed during June-August 2006. The pH, humidity, texture and electrical conductivity of each sample were tested; in order to determine the total aerobic bacteria recount the seriate dilution method was applied. The *in vitro* antimicrobial susceptibility and the extended-spectrum betalactamases (ESBLs) production were determined by the diffusion method in disk and double disk synergism. Samples from soils were neutral and alkaline. Samples of soils from papaya and lemon cultivars showed the highest total recounts of aerobic bacteria, with  $6,8 \times 10^{10}$  and  $8 \times 10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>, respectively. There was no association between bacterial count and pH. The identified species were *P. aeruginosa* (40%), *P. putida* (36%) and *P. mendocina* (24%). The 82% of the samples was within alkalinity pH range. *Pseudomonas* spp. showed 100% sensibility to amikacin, meropenem, imipenem, ciprofloxacin, cefepime, piperacillin-tazobactam and ceftazidime; resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole, aztreonam, ceftriaxone, ceftaxitin and cefotaxime; and this bacteria population did not present ESBLs. The environment isolates characterized as *Pseudomonas* spp. showed sensibility to most of the assayed antimicrobial agents, probably due to the little use of antibiotics in the agricultural cultivation maintenance in the region.

**KEY WORDS:** *Pseudomonas* spp., antimicrobial susceptibility, alkaline soils.

#### INTRODUCCIÓN

Los hábitat naturales de los microorganismos son extremadamente diversos, los suelos representan uno de ellos, por ser un ambiente ideal para el desarrollo microbiano (Madigan *et al.* 1999). De la diversidad bacteriana en los distintos ambientes, sólo entre 0,1 y 10% de las bacterias son cultivables, esto se atribuye al desconocimiento de requerimientos nutricionales y condiciones fisicoquímicas necesarias para su

desarrollo (Rondón *et al.* 1999, Torsvik y Ovreas 2002). Los géneros bacterianos frecuentemente aislados de suelos son *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Xanthomonas* (James 2000). Al respecto, Ownley *et al.* (2003) y De Souza *et al.* (2003) han publicado que las bacterias del género *Pseudomonas* son habitantes comunes del suelo.

*Pseudomonas* está ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentra en suelos, plantas, materia

orgánica en descomposición y aguas negras (Cobben *et al.* 1996). La taxonomía del género *Pseudomonas* se ha realizado por estudios de hibridación de su ADN. Con base en la secuenciación del rRNA 16S se ha dividido en los subgrupos acidovorans, *Pseudomallei*-cepacia, *Diminuta-vesicularis* y *fluorescente* (Madigan *et al.* 1999).

*Pseudomonas* puede colonizar de manera efectiva los órganos subterráneos de las plantas y promover su crecimiento de manera segura, por la capacidad de disminuir la acción de fitopatógenos por la producción de sideróforos y antibióticos (Lemanceau 1992, Cook 1993). Cuando el crecimiento vegetal se produce en ausencia de otros microorganismos, este se atribuye al incremento de la disponibilidad de nutrientes minerales, como el fosfato o el nitrógeno, debido a la producción de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal o a la degradación de precursores del etileno en la raíz por parte de estas bacterias (Glick 1995).

Es importante estudiar este género bacteriano a partir de su propio ecosistema; en el medio ambiente, continuamente, circula una gran cantidad de bacterias resistentes a los antibióticos, por el uso de los antimicrobianos en la práctica médica, veterinaria y en la agricultura (Levy 1991, Goñi-Urriza *et al.* 2000).

*P. aeruginosa* posee elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, lo que conlleva a una clara reducción de las posibilidades terapéuticas. La escasa permeabilidad de su membrana externa interviene en el mecanismo de la resistencia intrínseca, sin embargo, es probable, que el factor más importante sea la presencia de bombas de eflujo (Poole 2001, Hawkey y Munday 2004), en la que destaca el complejo proteico MexAB-OprM que expulsa antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim (Livermore 2002). *Pseudomonas* spp. puede producir enzimas  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles tipo AmpC y plasmídicas como las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM y OXA. La enzima PER-1, de codificación plasmídica o cromosómica, es una  $\beta$ -lactamasa con un espectro mucho más amplio, que se inhibe por ácido clavulánico y que inactiva ceftazidima, cefepima, aztreonam y ticarcilina y no confiere resistencia a piperacilina ni carbapenemas (Ambler 1980, Vila y Marco 2002). *P. aeruginosa* puede producir  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que traen como consecuencia alta frecuencia de cepas con características de multirresistencia (Coque *et al.* 2002).

La contaminación del ambiente con bacterias patógenas resistentes a los agentes antimicrobianos constituye un riesgo real, no sólo por ser fuente de infección, sino de bacterias portadoras de plásmidos de resistencia que pueden ser fácilmente diseminados a otras bacterias patógenas de diversos orígenes (Kruse y Sorum 1994). En este orden de ideas, Junco *et al.* (2006) señalan que la vigilancia de la resistencia bacteriana se ha realizado, en la mayoría de los casos, con bacterias aisladas de muestras clínicas; sin embargo, se debe estudiar en las aisladas de muestras ambientales a fin de conocer su posible papel como reservorio de genes codificadores de resistencia. De modo que, este trabajo planteó como objetivo evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos en aislados de *Pseudomonas* spp. procedentes de muestras de suelos de localidades agrícolas del estado Sucre, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo de suelos se realizó en tres localidades del estado Sucre, El Tacal, Los Hipures y San Juan. Se seleccionaron once suelos con cultivos que incluyeron dos de naranjo, yuca y limón, y uno de lechosa, plátano, cambur, piña y ciruela, en el periodo junio-agosto 2006. Durante el proceso de recolección, se evitó la selección de suelos cercanos a lugares contaminados, áreas recién fertilizadas, cerca de acequias, casas, canales, lugares de almacén de productos químicos o materiales orgánicos, y sitios donde hubo quemados recientes (Wollum 1994). Se recorrió el terreno y se delimitó el sitio seleccionado tomando en cuenta características homogéneas en toda su extensión. Se tomaron cinco muestras de suelos en cada cultivo, haciendo un recorrido sobre el terreno en forma diagonal, tomando de 100 a 200 g de muestra cada 20 ó 30 pasos, introduciendo una pala a una profundidad aproximada de 30 cm (Miller *et al.* 2002). Todas las muestras se mezclaron y de la muestra compuesta, se transfirieron entre 100 y 200 g a una bolsa plástica con cierre hermético, se procedió a identificarla y se llevaron al laboratorio para su análisis.

### Análisis fisicoquímico de los suelos

El pH fue determinado preparando una porción de suelo en H<sub>2</sub>O destilada estéril (1:2,5) (Gilbert de Brito *et al.* 1990). La humedad se realizó por diferencia de peso obtenido después de secar 10 gramos de cada una de las muestras a una temperatura de 105°C durante 5 días, la textura de los suelos se estimó tomando en cuenta la clase textural descrita por Bouyoucos (1962) y la conductividad eléctrica se midió utilizando una

relación 1:5 suelo-agua usando un conductímetro 441 marca Corning, obteniendo resultados en  $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

### Recuento total de bacterias aerobias

Para el cultivo microbiológico, se colocó 1 g de suelo en 10 mL de buffer estéril de sulfato de magnesio ( $0,1 \text{ mol/L MgSO}_4$ ) y se mezcló en rotador automático por 10 minutos para separar las bacterias adheridas a las partículas de suelo (Hagedorn *et al.* 1987; Miller *et al.* 2002). A partir de la muestra pre-tratada, se realizaron diluciones seriadas en caldo Luria Bertani (LB), desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$ ; posteriormente, se colocó 1 mL de cada dilución en una placa de Petri estéril y se agregó agar LB fundido con  $50 \mu\text{g/mL}$  de nistatina (para inhibir hongos), iniciando el proceso con la dilución  $10^{-3}$ , incubando las placas en atmósfera de aerobiosis y temperatura ambiente, durante 24 a 48 horas. Posteriormente, se procedió a determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo ( $\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) para el recuento total de bacterias aerobias (Hagedorn *et al.* 1987).

### Identificación bacteriana

El crecimiento bacteriano se valoró en el cultivo primario. Se aislaron las colonias de interés para obtener un cultivo bacteriano puro, utilizando agar tripticasa de soya (Himedia), Mac Conkey (Himedia) y Cetrimide (Himedia), para así continuar con el análisis (Miller *et al.* 2002). Se aplicó la coloración de Gram (Hucker y Conn 1923) y se identificaron las bacterias del género *Pseudomonas*, empleando pruebas bioquímicas convencionales (Koneman *et al.* 1999, Forbes *et al.* 2004).

### Prueba de sensibilidad a los antibacterianos

Se realizó según el método de difusión en disco (Bauer *et al.* 1966) y lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008) para *P. aeruginosa*. Se emplearon los discos de antibióticos (Oxoid, Inglaterra): amikacina ( $30 \mu\text{g}$ ), imipenem ( $10 \mu\text{g}$ ), ciprofloxacina ( $5 \mu\text{g}$ ), meropenem ( $10 \mu\text{g}$ ), cefepima ( $30 \mu\text{g}$ ), trimetoprim-sulfametoxazol ( $1,25/23,75 \mu\text{g}$ ), piperacilina-tazobactam ( $100/10 \mu\text{g}$ ), aztreonam ( $30 \mu\text{g}$ ), ceftriazona ( $30 \mu\text{g}$ ), cefoxitina ( $30 \mu\text{g}$ ), cefotaxima ( $30 \mu\text{g}$ ) y ceftazidima ( $30 \mu\text{g}$ ). Los aislados ensayados fueron clasificados en categorías de sensible, intermedio y resistente según los criterios del CLSI (2008). La detección de la producción de BLEE, se realizó por la técnica de sinergismo de doble disco, utilizando

piperacilina-tazobactam, ceftazidima, ceftriazona, cefotaxima y aztreonam, a una distancia de 20 mm entre los discos (Jarlier *et al.* 1988).

### Controles empleados

Se emplearon las cepas certificadas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controles de las pruebas bioquímicas y de susceptibilidad (Pagani *et al.* 2004).

### Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de múltiples variables para correlacionar tipo de suelos bajo cultivo, especies de *Pseudomonas* identificadas, pH de los suelos y contaje de bacterias aerobias totales, a un nivel de confiabilidad de 95% (Sokal y Rohlf 1979).

## RESULTADOS

La caracterización fisicoquímica de acuerdo a la clase textural, categorizó los suelos como arcillosos y arenoarcillosos con valores de pH de neutros a alcalinos (55% se ubicó dentro del rango de suelos alcalinos y 27% moderadamente alcalinos), medidas de conductividad eléctrica menores de  $3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , lo cual sugiere que son suelos ligeramente salinos y porcentajes de humedad dentro de un rango de 0,67 a 1,78% (Tabla 1).

El estudio mostró que los cultivos de lechosa y cambur presentaron los pH más elevados, con valores de 9,0 y 9,2, respectivamente. El pH más bajo se ubicó en 7,0, específicamente, en las muestras procedentes de los cultivos de limón. Los contajes de bacterias aerobias totales fueron elevados con valores entre  $3,9 \times 10^7$  y  $8 \times 10^{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , obteniéndose en todas las muestras un abundante crecimiento bacteriano; los cultivos de lechosa y limón 2 presentaron los recuentos de bacterias aerobias totales más elevados con  $8 \times 10^{10}$  y  $6,8 \times 10^{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. De acuerdo al análisis de múltiples variables, no hubo correlación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre pH y contaje de bacterias aerobias totales (Tabla 2).

La frecuencia de las especies de *Pseudomonas* en el total de muestras de suelo fue: 22 aislamientos de *P. aeruginosa* lo que representa 40%, seguido de *P. mendocina* y *P. putida* con 20 y 13 aislados para 36% y 24%, respectivamente.

Los resultados muestran que el 100% de los aislados

de *Pseudomonas* spp. fueron sensibles a siete de los doce antibióticos probados: amikacina, meropenem, imipenem, ciprofloxacina, cefepima, piperacilina-tazobactam y ceftazidima, y resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, aztreonam, ceftriazona, ceftaxima y cefotaxima (Tabla 3). En cuanto a la detección de la producción de BLEE, no hubo cepas con resultados positivos a esta prueba.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de suelos bajo cultivos en localidades agrícolas del estado Sucre.

Suelos bajo cultivo	pH del suelo	Conductividad eléctrica (dS.m <sup>-1</sup> )	Porcentaje de humedad	Clase textural
Limón 1	7,0	1,15	1,30	arenoarcilloso
Limón 2	7,0	1,24	1,31	arenoarcilloso
Ciruela	7,6	1,75	0,67	arenoarcilloso
Naranja 1	7,8	2,00	0,78	arenoarcilloso
Naranja 2	8,0	2,50	0,72	arenoarcilloso
Yuca 1	8,5	2,65	1,78	arcilloso
Yuca 2	8,5	2,63	1,76	arcilloso
Piña	8,6	2,80	1,20	arcilloso
Plátano	8,6	2,83	0,80	arenoarcilloso
Lechosa	9,0	2,89	0,68	arenoarcilloso
Cambur	9,2	2,91	0,81	arenoarcilloso

Tabla 2. Asociación de pH con el conteo de bacterias aerobias totales de suelos bajo cultivos procedentes de localidades agrícolas del estado Sucre.

Suelos bajo cultivo	pH del suelo	Contaje de bacterias aerobias totales (UFC.g <sup>-1</sup> )
Limón 1	7,0	5,3 x10 <sup>10</sup>
Limón 2	7,0	6,8 x10 <sup>10</sup>
Ciruela	7,6	3,4 x10 <sup>9</sup>
Naranja 1	7,8	1,9 x10 <sup>10</sup>
Naranja 2	8,0	2,2 x10 <sup>10</sup>
Yuca 1	8,5	3,9 x10 <sup>7</sup>
Yuca 2	8,5	4,2 x10 <sup>7</sup>
Piña	8,6	5,8 x10 <sup>9</sup>
Plátano	8,6	4,0 x10 <sup>10</sup>
Lechosa	9,0	8,0 x10 <sup>10</sup>
Cambur	9,2	5,2 x10 <sup>7</sup>

p > 0,05

Tabla 3. Susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas* spp. aislados de suelos bajo cultivos en localidades agrícolas del estado Sucre.

Antimicrobianos	Nº cepas sensibles	%	Nº cepas resistentes	%
Amikacina	55	100	0	0
Imipenem	55	100	0	0
Ciprofloxacina	55	100	0	0
Meropenem	55	100	0	0
Cefepime	55	100	0	0
Trimetoprim-sulfametoxazol	0	0	55	100
Piperacilina-tazobactam	55	100	0	0
Aztreonam	0	0	55	100
Ceftriaxona	0	0	55	100
Ceftaxima	0	0	55	100
Ceftazidima	55	100	0	0

## DISCUSIÓN

El estudio indicó que en todas las muestras, independientemente del tipo de cultivo, los contajes bacterianos fueron elevados. Estudios relacionados como los realizados por Krechel *et al.* (2002) y De Souza *et al.* (2003), obtuvieron, igualmente, resultados con contajes de bacterias aerobias totales elevados, con valores que oscilaron entre 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> y 5x10<sup>6</sup>-2x10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

En el presente estudio se destaca que no hubo asociación entre el pH y contaje de bacterias aerobias totales. Estos resultados difieren del estudio realizado por Hogberg *et al.* (2007), quienes analizaron muestras de suelos, indicando que la cantidad de bacterias se incrementó a medida que aumentó el pH, estos investigadores defienden que la composición de la comunidad microbiana en este tipo de ambiente depende del pH, así como también de la concentración de carbono y nitrógeno. Del mismo modo, Sarathachandra *et al.* (1984), reportaron que el desarrollo de la población microbiana no depende únicamente del pH del suelo, sino que además, está relacionado con factores como concentración de sales solubles, humedad, textura y materia orgánica, entre otros.

*P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. mendocina* fueron las especies identificadas en las muestras evaluadas; siendo *P. aeruginosa* la más frecuente. Sánchez *et al.* (2005) en un trabajo realizado a partir de muestras de suelo, obtuvieron que los microorganismos más frecuentemente

aislados fueron *Pseudomonas*, *Penicillium* y *Rhodotorula*, concluyendo en su investigación que éstos se encuentran asociados a la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa*. Por su parte, Agers y Sandvang (2005) estudiaron la presencia de genes de resistencia a tetraciclina e integrones clase 1 en un total de 257 aislados bacterianos de suelo, identificados como *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Arthrobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp. y *Corynebacterium glutamicum*.

La susceptibilidad antimicrobiana se estudió para conocer el posible reservorio de genes de resistencia en su ambiente natural y no con fines terapéuticos, como normalmente se aplica en la evaluación de especies bacterianas aisladas de muestras clínicas. Los resultados sugieren que las bacterias, en esta área geográfica en particular, están exentas del contacto con poblaciones bacterianas poseedoras de genes de resistencia para los agentes antimicrobianos ensayados y de una presión selectiva, ya que sólo se evidenció resistencia intrínseca en las bacterias, lo que permite explicar la alta sensibilidad antimicrobiana presentada por las especies evaluadas.

Según Livermore (2002), *Pseudomonas* presenta resistencia intrínseca natural a cefalosporinas de primera, segunda generación, cefotaxima, trimetoprim-sulfametoxazol y quinolonas de primera generación, resistencia atribuida a la impermeabilidad de la membrana, sistemas de bombas de flujo activo de expulsión del antibiótico y producción de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC. Es conveniente señalar que la resistencia a carbapenemas y aminoglucósidos en *P. aeruginosa* es de tipo adquirida, ya que cepas salvajes de esta bacteria presentan sensibilidad a dichas drogas; la resistencia a las mismas puede surgir como resultado de una presión selectiva sobre el ambiente en que se desarrolla la bacteria (Vila y Marco 2002). En relación a las quinolonas y aminoglucósidos, una investigación realizada por Ndip *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Los investigadores estudiaron 51 aislados de *P. aeruginosa* recuperados a partir de muestras clínicas y ambientales de varias instituciones de salud, obteniendo que 98% de los aislados fueron sensibles a ciprofloxacina y 90% a amikacina.

Los aislados bacterianos presentaron resultados negativos a la producción de BLEE, probablemente, debido a que estas bacterias en su ambiente natural no mantuvieron contacto con cepas poseedoras de elementos genéticos transferibles, codificadores de este tipo de enzimas, ni sometidas a presiones antibióticas selectivas. Autores como Jiang *et al.* (2006) y Martínez *et al.* (2003), citan un 45% y 38% de aislados clínicos de *P. aeruginosa*

productores de BLEE, respectivamente. La diferencia de los resultados de esta investigación con los citados anteriormente, pudiera atribuirse al tipo de ambiente donde se desarrollan las bacterias. La producción de BLEE, representa un serio problema epidemiológico que aumenta y se disemina rápidamente, como consecuencia del contacto de las bacterias, en su ambiente natural, con antibióticos de uso animal y vegetal empleados como promotores de crecimiento en especies animales, así como los usados en el mantenimiento de los cultivos agrícolas. Estos eventos pudieran en cualquier momento provocar la aparición de bacterias productoras de BLEE, lo que motiva su constante búsqueda.

## CONCLUSIONES

Los suelos bajo cultivo fueron neutros y alcalinos, presentaron abundante contaje de bacterias aerobias totales, y no hubo asociación entre esta última con el pH.

La especie más frecuente fue *Pseudomonas aeruginosa*, seguido de *P. mendocina* y *P. putida*.

Todos los aislados fueron sensibles a amikacina, meropenem, imipenem, ciprofloxacina, cefepima, piperacilina-tazobactam y ceftazidima, resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, aztreonam, ceftriazona, cefoxitina y cefotaxima, y no fueron productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

## RECOMENDACIÓN

Para comprender la función de los microorganismos del suelo, es necesario identificar y cuantificar los miembros de las comunidades microbianas, esto permitirá, entre otras cosas, ampliar conocimientos sobre mecanismos bioquímicos y fisiológicos desarrollados por las especies bacterianas; asimismo, futuras aplicaciones biotecnológicas que contribuyan a esclarecer muchas incógnitas que hoy se tienen en relación a mecanismos involucrados en resistencia bacteriana, éstas representan razones para estudiar las bacterias desde su propio ecosistema o nicho natural.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece a las personas de las localidades El Tacal, Los Hipures y San Juan del estado Sucre por la autorización en la recolección de las muestras y al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por el apoyo financiero en el Proyecto identificado con el código N° CI-2-040102-1283/06.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERS Y., SANDVANG D. 2005. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7941–7947.
- AMBLER R. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289: 321-331.
- BAUER A., KIRBY W., SHERRIS J., TURK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- BOUYOUCOS G. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agron J.* 54: 464-465.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement, 2008; M100-S18. Wayne, Pa, USA.
- COBBEN N., DRENT M., JONKERS M., WOUTERS E., VANECHOUTTE M., STOBBERINGH E. 1996. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. *J. Hosp. Infect.* 33:63-70.
- COOK R. 1993. Making grewter use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 53-80.
- COQUE T., OLIVER A., PÉREZ J., BAQUERO F., CANTÓN R. 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2 and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 500-510.
- DE SOUZA J., DE BOER M., DE WAARD P., VAN BEEK T., RAAIJMAKERS J. 2003. Biochemical, Genetic, and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7161–7172.
- FORBES B., SAHM D., WEISSFELD A. 2004. *Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico.* Undécima edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1115 p.
- GILABERT DE BRITO J., LÓPEZ I., PÉREZ R. 1990. Análisis de suelos para diagnóstico de fertilidad. Manual de métodos y procedimientos de referencia. FONAIAP. Serie A. N° 26.
- GLICK B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- GOÑI-URRIZA M., CAPDEPUY M., ARPIN C. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 125-132.
- HAGEDORN C., GOULD W., BARDINELLI T., GUSTAVSON D. 1987. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2265-2268.
- HAWKEY P., MUNDAY C. 2004. Multiple resistance in Gram-negative bacteria. *Rev. Med. Microbiol.* 15:51-61.
- HOGBERG M., HOGBERG P., MYROLD D. 2007. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia.* 150: 590-601.
- HUCKER V., CONN H. 1923. *Methods of Gram staining.* Technology Bulletin New York. Station Agriculture experimental. 93: 1-37.
- JAMES E. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research.* 65:197-209.
- JARLIER V., NICOLAS M., FOURNIER G., PHILIPPON A. 1988. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10: 867-878.
- JIANG X., ZHANG Z., LI M., ZHOU D., RUAN F., LU Y. 2006. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2990-2995.
- JUNCO R., SUÁREZ M., WENG Z., CHIROLES S., GONZÁLEZ M., DÍAZ O., RODRÍGUEZ M. 2006. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Hig. Sanid. Ambient.* 6: 150-159.

- KONEMAN E., ALLEN S., JANDA W. 1999. Diagnóstico microbiológico. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina. 2400 p.
- KRECHER A., FAUPEL A., HALLMANN J., ULRICH A., BERG G. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canad. J. Microbiol.* 48: 772-786.
- KRUSE H., SORUM H. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4015-4021.
- LEMANCEAU P. 1992. Effets bénéfiques de Rhizobactéries sur plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescens. *Agronomie.* 12: 413-434.
- LEVY S. 1991. Antibiotic Availability and Use: Consequences to Man and His Environment. *J. Clin. Epidemiol.* 44: 83S-87S.
- LIVERMORE D. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* 34: 634-640.
- MADIGAN M., MARTINKO J., PARKER J. 1999. Brock. Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice hall Iberia. Madrid-España. 1064 p.
- MARTÍNEZ P., MERCADO M., MÁTTAR S. 2003. Determinación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colomb. Med.* 34: 196-205.
- MILLER S., LIPUMA J., PARKE J. 2002. Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3750-3758.
- NDIP R., DILONGA H., NDIP L., AKOACHERE J., NKUO T. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from clinical and environmental samples in Buea, Cameroon: current status on biotyping and antibiogram. *Trop. Med. Int. Health.* 10: 74-81.
- OWNLEY B., DUFFY B., WELLER D. 2003. Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3333-3343.
- PAGANI L., MANTENGOLI E., MIGLIAVACCA R., NÚCLEO E., POLLINI S., SPALLA M., DATURI R., ROMERO E., ROSSOLINI G. 2004. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase in Northern Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2523-2529.
- POOLE K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 255-264.
- RONDÓN M., GOODMAN M., HANDELSMAN J. 1999. The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.* 17: 403-409.
- SÁNCHEZ J., VALENCIA H., VALERO N. 2005. Reducción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizosfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del páramo el granizo. En: Bonilla M. Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la Cordillera Oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos. p. 177-193.
- SARATHACHANDRA S., PENOTT K., UPSDELL M. 1984. Microbiological and biochemical characteristics of a range of New Zealand soils under established pasture. *Soil. Biol. Biochem.* 16: 177-183.
- SOKAL R., ROHLF F. 1979. Biometría principios y métodos estadísticos en investigación biológica. H. Blume editorial. Barcelona, 832 p.
- TORSVIK V., OVREAS L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- VILA J., MARCO F. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos Gram negativos no fermentadores. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20: 304-312.
- WOLLUM A. 1994. Soil sampling for microbiological analysis. In Weaver R, Angle S, Bottomley P, Bezdick D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A. (ed), Methods of soil analysis part 2. Microbiological and biochemical properties. Book series no. 5. Soil Science Society of America, Madison, Wis pp. 1-14.