

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

DETECCIÓN DE BIOPELÍCULA Y AGREGACIONES BACTERIANAS EN
BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES PRESENTES EN
SEDIMENTOS DE AGUAS TERMALES. CARIACO, MUNICIPIO RIBERO,
ESTADO SUCRE.

(Modalidad: Trabajo de grado)

PIERINA PAOLA RIVAS HERNÁNDEZ

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

Cumanà 2011.

DETECCIÓN DE BIOPELÍCULA Y AGREGACIONES BACTERIANAS EN
BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES PRESENTES EN
SEDIMENTOS DE AGUAS TERMALES. CARIACO, MUNICIPIO RIBERO,
ESTADO SUCRE.

APROBADO POR:



Prof. Yasmina Araque C
Asesora Académica



Jurado



Jurado

INDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Población o área de estudio	8
Recolección de las muestras	8
Dilución y siembra de la muestra	8
Caracterización Morfológica de las colonias.....	9
Caracterización microscópica de las colonias	9
Identificación bioquímica de BGNNF.....	9
Prueba de la oxidasa	9
Fermentación de azúcares	10
Motilidad.....	10
Utilización de carbohidratos Reacción Hugh- Leifson O/F para no fermentadores (glucosa, maltosa, manitol y sacarosa)	10
Descarboxilación de lisina e hidrólisis de la arginina.....	11
Hidrólisis de urea	11
Prueba de la agregación salina (PAS)	11
Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de biopelículas a través del método de rojo congo (MRC).....	12
Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos	12
Análisis de datos	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	24
RECOMENDACIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA	26
HOJA DE METADATOS	30

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a:

DIOS Todopoderoso, por haberme dado la sabiduría para alcanzar tan anhelado sueño.

Daxy Hernández, mi madre, por darme el don de la vida, por confiar en mí. Sin ti este sueño nunca hubiese podido ser completado. Sencillamente, tú eres la base de mi vida profesional y toda la vida te estaré agradecida. Realmente no hay palabras que logren expresar lo mucho que quiero agradecerte.

Mis amigas Johana M., Edith A., Yohanna V., Vicmarys M., por haber estado conmigo en todo momento, por haberme enseñado a sonreírle a la vida y demostrar que si se pueden realizar los sueños.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS; por demostrarme tantas veces su existencia y con ello darme fuerzas para salir adelante frente a cada tropiezo.

A mi madre; por su apoyo incondicional en todo momento, mi abuela y hermanas por su entrega y humildad que me han enseñado tanto.

A la profesora Yasmina Araque; por ser la principal guía para la realización del presente trabajo.

A la profesora Dina Antón; por su apoyo y colaboración para la realización de este trabajo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de bacterias provenientes de muestras de sedimentos de cuatro pozas de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010	15
Tabla 2. Distribución porcentual de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) provenientes de muestras de sedimentos de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010	17
Tabla 3. Comportamiento de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) frente a la técnica del rojo congo para la detección de la formación de biopelículas, en cuatro pozas de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010	20
Tabla 4. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> y <i>A. baumannii</i> , provenientes de los sedimentos de las márgenes de las aguas termales del balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Producción de exopolisacáridos determinados a través del método rojo congo en cepas de *P.aeruginosa* provenientes de muestras de sedimentos de cuatro pozas de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010. Morfología típica de las colonias de *P. aeruginosa* por el método del agar rojo congo. A. cepa control positivo (*P. aeruginosa* ATCC 27853), B. colonias blancas (formadoras de biopelículas), C. colonias rojas (no formadoras de biopelículas)..... 18

RESUMEN

Con la finalidad de detectar biopelículas y agregaciones bacterianas en bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) presentes en sedimentos de aguas termales pertenecientes a las aguas de Moisés, Cariaco, municipio Ribero, estado Sucre, se realizó el presente trabajo de investigación, en el periodo comprendido entre octubre del año 2009 y enero del año 2010. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales; la presencia de biopelícula y agregación bacteriana se realizó mediante los métodos de rojo congo y agregación salina, respectivamente. Se realizó la prueba de susceptibilidad empleando el método de difusión en agar. De las bacterias aisladas, 36 (51,43%) pertenecieron a la familia *Enterobacteriaceae*, 8 (11,43%) aislados de cocos Gram positivos y 26 (37,14%) aislados de BGNNF; entre éstos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, grupo *Stutzeri* CDC Vb-3 fueron las bacterias más frecuentemente aisladas, en las pozas estudiadas. El 90,00% de las cepas estudiadas presentaron un alto grado de hidrofobicidad, indicando su capacidad de adhesión, necesitando bajas concentraciones de sales para precipitar. De las 26 cepas estudiadas, 21 (80,77%) resultaron ser rojo congo positivo y 5 (19,23%) fueron rojo congo negativo. Las cepas de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii* mostraron 100,00% de sensibilidad a los antimicrobianos empleados. Las cepas de BGNNF resultaron ser altamente hidrofóbicas, lo que les permite adherirse a superficies y favorece la formación de biofilm. De acuerdo a estos resultados, los BGNNF aislados son formadores de biopelículas lo que permite su colonización en diversos ambientes, estos pueden ser considerados como microorganismos con potencial de biorremediación de ambientes contaminados.

INTRODUCCIÓN

El término biopelícula (biofilm) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75,00%) y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas. El exopolímero que es producido por los mismos microorganismos, forma una matriz adherente en donde estos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos, las unidades respectivas de los exopolisacáridos son hexa-sacáridos compuestos de cuatro azúcares diferentes en los cuales los grupos acetilo y piruvato están siempre presentes; muchas bacterias poseen una capa adicional de exopolisacárido, estos son macromoléculas de carbohidratos sintetizadas por enzimas asociadas a la membrana interna empleando sustratos citoplasmáticos, debiendo cruzar la pared bacteriana antes de ser liberados en el medio extracelular (Costerton, 1999).

Las biopelículas poseen múltiples características, que las convierte en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen; una de estas características es la heterogeneidad, lo que las hace organizaciones únicas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos. Se ha visto que las bacterias son capaces de sobrevivir en medios que presentan diferente pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno (Vroom *et al.*, 1999).

Las biopelículas bacterianas empiezan a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie, la capacidad de la célula para realizar este ataque inicial depende de factores ambientales como la temperatura, el pH y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas. La formación de biopelículas está asociada con la capacidad para persistir en diversos ambientes, lo que contribuye a la patogenicidad de diversas especies. Se ha demostrado también que las bacterias que crecen en biopelículas son más resistentes a

agentes antimicrobianos que las que crecen en cultivos planctónicos debido a su estructura física y a la conformación de multicapas (Donlan y Costerton, 2002).

La hidrodinámica juega un papel importante en el desarrollo de las biopelículas pues estas organizaciones se desarrollan en una interface líquido-sólido donde la velocidad del flujo que lo atraviesa influye en el desprendimiento físico de los microorganismos. Además, poseen un sistema de canales que les permiten el transporte de nutrientes y desechos. Otra característica de las biopelículas es su resistencia a las defensas del hospedero y agentes antimicrobianos, mientras que los microorganismos aislados son susceptibles a estos factores de control, las colonias organizadas e incluidas en el exopolímero forman una capa impermeable en donde sólo los microorganismos más superficiales se ven afectados (Stoodley *et al.*, 1999; Donlan, 2002).

En los primeros trabajos sobre la estructura de las biopelículas, una de las incógnitas que surgía con mayor reiteración era cómo las bacterias del interior de éstas podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno. Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz de las biopelículas no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, incluso hasta las zonas más profundas de las biopelículas. La existencia de estos canales es lo que permite, que dentro de ésta, se encuentren variados ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro de la biopelícula (Davey y O'Toole, 2000; Stoodley *et al.*, 2002).

Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), son un grupo de microorganismos aerobios, no esporulados que degradan los hidratos de carbono por vía oxidativa (Koneman *et al.*, 2008). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza: agua, plantas, suelos húmedos, mucosas y tracto digestivo de hombres y animales (Finegold y Baron, 1992). Dentro del grupo de los BGNNF, el género

Pseudomonas es el de mayor importancia clínica y el más frecuentemente aislado. Algunas *Pseudomonas*, producen pigmentos solubles en agua, soportan una gama muy variada de condiciones adversas, como temperaturas elevadas y cloración intensa, capaces de crecer entre 4 y 43°C (Pumarola *et al.*, 1992; Rodríguez, 1997).

El metabolismo de los BGNNF puede ser respiratorio, o anaerobio. Presentan una versatilidad metabólica que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono, substratos muy variados que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros microorganismos puedan utilizar. Esto confiere una gran importancia a las bacterias del género *Pseudomonas* como digestores aerobios de materiales de desecho, lo que las ha hecho excelentes candidatas para el tratamiento de contaminaciones ambientales producidas por la acumulación de metales pesados o compuestos xenobióticos, entre otros, con lo que se contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica (Hardalo y Edberg, 1997).

Los BGNNF poseen la característica de ser rectos o ligeramente curvos, la mayoría de las cepas son móviles por medio de uno o varios flagelos polares; también se caracterizan por presentar, adhesinas de naturaleza proteica, muy hidrofóbicas, las cuales necesitan pocas concentraciones de sales para precipitar, esto quiere decir que a mayor cantidad de proteínas mayor será su hidrofobicidad. Esta propiedad permite medir el grado de adhesión de las bacterias a diferentes superficies, siendo la adhesión la etapa inicial en la formación de las biopelículas (Koneman *et al.*, 2008).

La capacidad de formar biopelículas no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y, en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, independientemente de la especie, pueden existir dentro de biopelículas (Anderl *et al.*, 2000; Chole y Faddis, 2003; Post *et al.*, 2004; Thomas y Nakaishi, 2006).

Entre las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas capaces de formar biopelículas se encuentran: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp, *Streptococcus mutans*. Cabe destacar que en bacterias Gram negativas se ha visto que los flajelos, las fimbrias de tipo I, IV son importantes para la etapa de adherencia primaria; y la movilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar a las repulsiones hidrofóbicas (Mandell *et al.*, 2000; Koneman *et al.*, 2008; O' Toole *et al.*, 2000).

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa común en el ambiente, incluyendo suelo, agua y plantas; los flagelos, pili tipo IV y la matriz exopolisacárida han sido implicados en la formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa*. Esta bacteria utiliza un mecanismo de señalización extracelular llamado quórum-sensing (QS) para coordinar la formación y desarrollo de biopelículas. Además, el QS regula la producción de factores de virulencia como la elastasa y la respuesta al estrés oxidativo (Bodey *et al.*, 1983; Pearson *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1998; Hassett *et al.*, 1999).

Los exopolisacáridos son fundamentales para diversos procesos, tales como la viabilidad celular, la comunicación célula-célula, la interacción bacteria-célula. Estas macromoléculas de carbohidratos son sintetizadas por enzimas asociadas a la membrana interna empleando sustratos citoplasmáticos, debiendo cruzar la pared bacteriana antes de ser liberadas en el medio extracelular. Así, en la bacteria Gram negativa la cadena en crecimiento debe atravesar el espacio periplásmico incluyendo la red de la cubierta de péptidoglicanos, junto con la membrana externa (Hostaka *et al.*, 2002).

Estudios ecológicos sobre la microbiota de manantiales termales han cambiado nuestra visión de la biodiversidad microbiana y de su composición, estructura y

función. En los últimos años se han descrito varios tipos de comunidades microbianas en diferentes manantiales calientes (Ward *et al.*, 1998) y se han aislado un gran número de nuevas bacterias termófilas (Stetter, 1996).

Los ríos, arroyos, lagunas, manantiales y otras fuentes de aguas, pueden contaminarse con descargas de drenajes de grandes ciudades, por actividades agropecuarias industriales y descargas de tóxicos, esto favorece la colonización por microorganismos patógenos u oportunistas. La introducción de agentes causales de enfermedades a las aguas, en ocasiones, puede deberse a una inadecuada utilización de éstas por parte del ser humano, lo que ocasiona serios problemas al medio ambiente y la manifestación de enfermedades infecciosas en el individuo por microorganismos patógenos (Romero y Salas, 1993).

Siendo el agua un recurso imprescindible para la vida y el desarrollo socioeconómico, industrial y agrícola, la contaminación de la misma, plantea un problema de salud pública. Al respecto, el grupo de expertos sobre aspectos científicos de contaminación marina (GESAMP) han advertido sobre la necesidad imperativa y urgente de crear programas de monitoreo continuos de los ecosistemas acuáticos, especialmente ríos y aguas costeras, para obtener información que permita diseñar planes de control, ordenación, manejo y uso de los cuerpos de agua (Ress, 1993; Taylor, 1993).

Las aguas minerales de balnearios termales presentan una gran diversidad de microorganismos autóctonos característicos de cada tipo de agua y dependen de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH, composición), predominando en estos ambientes las bacterias heterótrofas oligotróficas de los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. En menor número se encuentran microorganismos autótrofos (quimiolitotrofos y fototrofos), también puede haber en ellas microorganismos alóctonos, procedentes de otros hábitat, considerados contaminantes, que coexisten con los anteriores, pero es rara la presencia de indicadores fecales y bacterias patógenas. En los manantiales hipertermales

predominan las bacterias Gram positivas mientras que en los mesotermales son los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos (Romero y Salas, 1993).

Las biopelículas representan una estrategia de supervivencia, pues proporciona una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana. La importancia de las biopelículas se comenzó a estudiar desde mediados de la década de 1970, cuando se hablaba de los efectos en los diversos ambientes naturales de estas organizaciones. Después de este periodo se inició el desarrollo de técnicas microscópicas más avanzadas que permitieron entender la ultra estructura y dinámica de estas asociaciones, se pudo constatar este hecho y se comenzaron a involucrar en múltiples y distintos eventos que tienen impacto sobre el bienestar del hombre y su entorno (McCarthy, 2001).

El estado Sucre comprende toda una riqueza natural, histórica y cultural que lo hace ser destino turístico demandado a nivel nacional e internacional, donde en un territorio de 11.800 kilómetros cuadrados cohabitan tres parques nacionales y más de 60 monumentos naturales entre éstos se encuentran las Aguas de Moisés, ubicadas en el sector Río Azul, asentamiento campesino Pantoño, Municipio Ribero, vía Cariaco/Casanay. En este municipio se encuentran diferentes centros turísticos tipo balnearios tales como Poza Azul, Cristal, Paraíso, entre otros, los cuales se han instalado dada las condiciones físico naturales que tiene la zona; entre ellas se identifican las afluentes de aguas termales. Estas aguas provienen de capas subterráneas que se encuentran a mayor temperatura, las cuales son ricas en diferentes componentes minerales y permiten su utilización en la terapéutica como baños, irrigaciones y calefacción, así como también para fines médicos, como terapias rehabilitantes, además de usarse con fines recreativos para muchos bañistas (Fernández, 2008).

Hoy en día, el estudio de las biopelículas se hace cada vez más extenso y complejo en cada una de las áreas donde se trabaja, por eso es necesario demostrar a través de

estudios bacteriológicos la presencia de bacterias del género *Pseudomonas*, que conforman las biopelículas que allí se desarrollan, las cuales son excelentes candidatas para el tratamiento de contaminaciones ambientales y que a futuro pueden emplearse con fines biotecnológicos con el propósito de erradicar patógenos presentes en estos ambientes, así mismo contribuyendo al reciclaje biológico de materia orgánica.

METODOLOGÍA

Población o área de estudio

En el presente estudio se analizaron muestras de sedimento de cada una de las siguientes pozas: bella vista, cascada Abrahán, isla palma sola, piscina Moisés, pertenecientes a las Aguas de Moisés, las cuales están ubicadas en el sector Río Azul, asentamiento campesino Pantoño, Municipio Ribero, vía Cariaco/Casanay estado Sucre, Venezuela., durante el periodo comprendido entre octubre de 2009 y enero de 2010.

Recolección de las muestras

Se realizaron 2 muestreos de sedimento por duplicado cada uno de ellos. Las muestras se recolectaron en tubos cónicos de plástico de 50 ml. Posteriormente, se transportaron al Laboratorio de Investigación Bacteriológica del Departamento de Bioanálisis, a temperatura ambiente y en aerobiosis para mantener inalterables las condiciones de vida de los microorganismos existentes. En el proceso de muestreo se llevó un registro de la temperatura y pH usando un termómetro y un pHmetro, respectivamente.

Dilución y siembra de la muestra

Se pesó 1 g de sedimento para ser diluido en 10 ml de solución salina fisiológica y luego se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-9} en solución salina fisiológica y posteriormente las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} , fueron sembradas en placas de Petri, a las cuales se les añadió 15 ml de agar nutritivo. Luego, todas las placas sembradas se incubaron a una temperatura de 37°C en aerobiosis durante 24 h y se estimó el contaje total de microflora cultivable para esas condiciones (Mulusky, 1974).

Caracterización Morfológica de las colonias

Una vez transcurrido el período de incubación se realizó la caracterización morfológica de las colonias bacterianas en las placas de cultivo donde se podían visualizar con claridad las colonias aisladas (diluciones 10^{-4} y 10^{-5}) y se seleccionaron en base a: aspecto, consistencia, tamaño, forma y producción de pigmento.

Caracterización microscópica de las colonias

Se procedió a realizar la caracterización microscópica de las colonias seleccionadas por medio de la coloración de Gram (Hucker y Conn 1923), observándose al microscopio para comprobar la presencia de bacilos Gram negativos. Así mismo, se realizaron, subcultivos de las colonias seleccionadas en agar MacConkey, se incubaron por 24 hasta 72 h, a una temperatura de 37°C, en aerobiosis.

Identificación bioquímica de BGNNF

Se aplicaron los procedimientos descritos por Koneman *et al.* (2008) y Finegold y Baron (1992), mediante el empleo de las pruebas bioquímicas señaladas a continuación:

Prueba de la oxidasa

Se tomó con un palillo de madera una colonia procedente de agar nutritivo colocándose luego sobre un trozo de papel de filtro, previamente impregnado con el reactivo tetrametil p-fenilendiamina (reactivo incoloro en su forma reducida). Se esperó un tiempo de 10 segundos y al aparecer un color morado (en el lugar donde fue colocada la colonia) se comprobó la positividad de la prueba, la ausencia de este color denota la prueba negativa. Esta prueba es útil para diferenciar colonias sospechosas que pueden pertenecer a la familia de enterobacterias (oxidasa negativa) y para identificar a las sospechosas que pertenecen a otros géneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, entre otros oxidasa positiva.

Fermentación de azúcares

Los tubos con el medio solidificado en bisel, se inocularon con una colonia aislada proveniente de las placas con agar MacConkey, la cual fue sembrada hasta la profundidad en el tubo, posteriormente se colocaron los tubos en una incubadora a 37°C de 24 h hasta 96 h. Este medio fue útil para la diferenciación de enterobacterias, tomando en cuenta la capacidad de fermentar lactosa o glucosa, así como la producción de ácido sulfhídrico H_2SO_4 y gas. La interpretación de la lectura fue de la siguiente manera: fondo ácido (amarillo) y pico alcalino (rojo): fermentación de glucosa. Ácido todo el medio: fermentación de glucosa y lactosa. Medio totalmente rojo: no hubo fermentación de azúcar. Ennegrecimiento del medio siguiendo la línea de inoculación y en toda la capa de la superficie: producción de ácido sulfhídrico.

Motilidad

La motilidad se determinó utilizando el agar motilidad, la cepa se inoculó por punción. Luego fue incubada a 37°C de 24 a 96 h. Esta técnica se utilizó para detectar la motilidad de las especies bacterianas, ya que las bacterias se mueven a través de flagelos cuyo número y localización varían entre las diferentes especies. La prueba de motilidad se interpretó haciendo un examen macroscópico del medio para detectar una zona difusa de crecimiento (turbidez) que se proyecta en la parte superior del agar.

Utilización de carbohidratos Reacción Hugh- Leifson O/F para no fermentadores (glucosa, maltosa, manitol y sacarosa)

Se utilizaron dos tubos para cada carbohidrato, los cuales contenían el medio solidificado en forma de taco, y se procedió a inocular por punción la colonia sospechosa. Posteriormente, se le agregó a uno de los tubos unas gotas de parafina líquida para crear un ambiente anaerobio y luego los tubos fueron incubados aproximadamente a 37°C de 24 a 96 h. Esta prueba se utilizó con la finalidad de determinar la vía de utilización de la glucosa (vía fermentativa, oxidativa o ambas) por

las bacterias. La producción de ácido se detectó en el medio por la aparición de un color amarillo. En el caso de microorganismos oxidativos o no fermentadores, este apareció en la superficie del tubo que no contenía la parafina, mientras que en el otro tubo no hubo viraje de color.

Descarboxilación de lisina e hidrólisis de la arginina

Al caldo base Moeller se le añadió el aminoácido correspondiente (lisina y arginina al 1% en tubos separados). Se procedió a inocular con la cepa bacteriana y posteriormente, se le agregó una capa de parafina a cada tubo hasta que cubriera aproximadamente un centímetro de altura, con el fin de disminuir la tensión de oxígeno; luego se incubaron a 37°C por 24 h. Esta prueba se utilizó con la finalidad de determinar la capacidad de la bacteria para producir enzima descarboxilasa específica capaz de atacar aminoácidos hasta aminas que elevan el pH del medio y hacen virar el indicador púrpura de bromocresol, a púrpura intenso, considerando la prueba positiva.

Hidrólisis de urea

Las colonias sospechosas fueron inoculadas en tubos que contenían agua peptonada a las que se les agregó 3 a 4 gotas del reactivo de urea, luego se incubaron a 37°C por 24 h. La aparición de un color rosado intenso indicó un resultado positivo. Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea, con lo cual se libera amonio.

A las bacterias identificadas como BGNNF se les realizó una suspensión en caldo BHI, a partir de la cual se realizaron las siguientes pruebas:

Prueba de la agregación salina (PAS)

Previamente se prepararon diferentes concentraciones de sulfato de amonio (0,5; 1,0;

1,5; 2,0 mol.l⁻¹); luego en una lámina portaobjeto, se mezclaron 25 µl de la suspensión bacteriana y 25 µl de las diferentes concentraciones de sulfato de amonio se rotaron continuamente de forma manual durante 2 minutos. Posteriormente, se observaron en el microscopio, reportándose como positivo la presencia de grumos o agrupaciones en la mezcla y como negativo la no agregación o grumos en la mezcla.

Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de biopelículas a través del método de rojo congo (MRC)

Una vez identificada la especie bacteriana se procedió a tomar una asada de la suspensión bacteriana y se sembró en placas de agar nutritivo con 0,025% del indicador rojo congo, el cual permite observar una morfología colonial característica de las cepas según su producción o no de exopolisacáridos, las placas se incubaron a 37°C, por 18 h. (Bravo *et al.*, 2005). Se usó como cepa control *P. aeruginosa* ATCC 27853 (productora de exopolisacárido). El crecimiento de las colonias blancas en el agar rojo congo fue indicativo de un resultado positivo y el crecimiento de colonias rojas como negativo.

Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos

Para la realización de la prueba de susceptibilidad se empleó el método de difusión en agar descrito por Bauer *et al.* (1966), y se siguieron los lineamientos establecidos por el Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, 2009). El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se inocularon de 4 a 5 colonias aisladas del microorganismo identificado en 4,5 ml de solución salina fisiológica, hasta obtener una suspensión, equivalente a una concentración de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml ajustándola con un patrón 0,5 de la escala de Mac Farland. Luego, se humedeció un hisopo de algodón estéril con la suspensión bacteriana, se diseminó sobre la superficie de la placa de agar Müeller Hinton. Se dejó secar de 3 a 5 minutos y luego, se procedió a colocar los discos de antibióticos de elección: ceftazimida (30 µg), gentamicina (10 µg),

piperacilina (100 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) y tobramicina (10 µg). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en aerobiosis, al cabo de este tiempo se procedió a realizar la lectura de los halos de inhibición con una regla milimetrada, los resultados obtenidos se compararon con los diámetros de las zonas de inhibición, según las categorías establecidas por el CLSI 2009 (sensible, intermedio y resistente), se emplearon como cepas controles *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Análisis de datos

Los datos obtenidos en el estudio, fueron representados por medio de gráficos y/o tablas (Morton *et al.*, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio de un total de 70 bacterias positivas de muestras de sedimentos provenientes de las diferentes pozas ubicadas el sitio turístico Aguas de Moisés, se aislaron 36 pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, 8 de cocos Gram positivos y 26 de BGNNF.

Reportes a nivel mundial, afirman que el aislamiento de los BGNNF, como agentes causales de infecciones humanas, ha venido ascendiendo de manera significativa (Morales *et al.*, 2007). Por otro lado, la escasa disponibilidad de métodos y herramientas en los laboratorios de diagnóstico bacteriológico de rutina, para una acertada identificación de dichas bacterias, han favorecido el hecho de que se disponga de poca información respecto al aislamiento de estos microorganismos, tanto a nivel hospitalario y comunitario.

En la tabla 1 se muestra la distribución de los diferentes grupos de bacterias aislados según la procedencia de las pozas, donde 36 (51,43%) cepas aisladas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, seguido de 26 (37,14%) correspondiente a BGNNF y, por último 8 (11,43%) aislados de cocos Gram positivos. En la poza 1 se obtuvo un total de 5 cepas de BGNNF, sólo 1 cepa de cocos Gram positivos y 10 cepas del grupo de *Enterobacteriaceae*, en la poza 2, fueron 7 cepas de BGNNF, 2 de cocos Gram positivos y 6 del grupo *Enterobacteriaceae*; en la poza 3 los aislados de BGNNF fueron 8, de cocos Gram positivos 4 cepas, y 15 del grupo *Enterobacteriaceae*; en la poza 4 se obtuvo un total de 6 cepas de BGNNF, sólo 1 cepa de cocos Gram positivos y 5 del grupo de *Enterobacteriaceae*. En el caso de BGNNF se obtuvieron en la poza 1 un total de 5 cepas (7,14%), en la poza 2 fueron 7 (10,00%), en la poza 3 con mayor cantidad de cepas aisladas un total de 8 (11,43%) y, por último en la poza 4 un total de 6 cepas (8,57%).

Estos resultados muestran que los microorganismos con más frecuencia de aislamientos fueron los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, representando el 51,43% de todos los aislamientos, mientras que los BGNNF se aislaron en el 37,14% y los cocos Gram positivos en el 11,43%.

Tabla 1. Frecuencia de bacterias provenientes de muestras de sedimentos de cuatro pozas de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010

Pozas estudiadas	BGNNF		Cocos Gram positivos		Enterobacterias		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
P1	5	7,14	1	1,43	10	14,29	16	22,86
P2	7	10,00	2	2,86	6	8,57	15	21,43
P3	8	11,43	4	5,71	15	21,43	27	38,57
P4	6	8,57	1	1,43	5	7,14	12	17,14
Total	26	37,14	8	11,43	36	51,43	70	100,00

Las pozas en estudio fueron designadas arbitrariamente como p1, p2, p3, p4.

Es importante resaltar que el 38,57% de los aislados pertenecieron a la poza 3, existiendo un predominio de enterobacterias (21,43%); sin embargo, el porcentaje de BGNNF resultó ser 11,43%. Se pudo observar que la poza número 3 poseía agua donde hay poca o nula renovación y a diferencia de las demás pozas, ésta no presenta canales que permitan circulación constante de agua, además de estar rodeada de árboles que no permiten la entrada directa de los rayos solares.

Dentro del grupo de BGNNF se encuentran muchos géneros y especies, pero los más

frecuentemente aislados de muestra clínicas, son *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* sp. El reservorio de estos microorganismos se encuentra en el medio ambiente y en múltiples fuentes (suelo, agua, plantas, animales) y raramente forman parte de la flora humana normal. En este caso los BGNNF se encontraban en su entorno natural. En la tabla 2 se observa la distribución porcentual de los BGNNF en las cuatro pozas estudiadas en las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés”, se observa una diversidad de especies bacterianas, siendo las más predominantes *P. aeruginosa*, grupo *Stutzeri* CDC Vb-3 y *P. mendocina* con un total de 5 cepas (19,23 %) cada una, distribuidas de la siguiente manera en cada una de las pozas: *P. aeruginosa* se aisló en las pozas 2 y 3 con 3 cepas (11,43%) y 2 cepas (7,69%), respectivamente; grupo *Stutzeri* CDC Vb-3 distribuidas uniformemente en cada una de las pozas: 1, 2 y 4 con 1 (3,85%) cada una; *P. mendocina* poza 2 con 1 (3,85%) y pozas 3 y 4 con 2 (2,79%) cada una, obteniéndose otras especies en menor frecuencia, tales como: *P. pseudoalcaligenes* con un total de 4 (15,38%), en las pozas 1 y 2 se obtuvo 1 cepa (3,85%) en cada una de ellas, en la poza 4 fueron 2 cepas (7,69%); *P. stutzeri* con un total de 3 (11,53%) cepas aisladas, con 1 cepa (3,85%) en cada una las pozas 1, 3 y 4; *A. baumannii* sólo se aislaron 2 (7,69%) cepas en la poza 1; *S. maltophilia* fue aislada en dos pozas la 2 y la 3 con una 1 (3,85%) cepa en cada una de ellas.

Las pozas estudiadas presentaron diversidad de BGNNF, los cuales no son específicos de cada una de ellas. Sin embargo, se observa una cierta relación entre algunos microorganismos y las aguas con características fisicoquímicas más extremas de pH y temperatura. Las pozas en estudio presentaron un pH que oscila entre 6,5 y 8,0 y una temperatura de 33 a 35°C. Los manantiales con pH alcalino tienen diversidad microbiana, encontrándose *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, y *Exiguobacterium* sp; que pueden vivir a estos pH y los de pH ácido presentan un número de bacterias muy pequeño, principalmente bacilos Gram positivos irregulares.

En los manantiales hipertermales predominan las bacterias Gram positivas, mientras que en los mesotermes son los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos (Mosso *et al.*, 1994).

Tabla 2. Distribución porcentual de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) provenientes de muestras de sedimentos de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010

Especie bacteriana	Poza n° 1		Poza n°2		Poza n°3		Poza n°4		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	3	11,53	2	7,69	-	-	5	19,23
<i>Grupo Stutzeri CDC Vb-3</i>	1	3,85	1	3,85	2	7,69	1	3,85	5	19,23
<i>P. mendocina</i>	-	-	1	3,85	2	7,69	2	7,69	5	19,23
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	1	3,85	1	3,85	-	-	2	7,69	4	15,38
<i>P. stutzeri</i>	1	3,85	-	-	1	3,85	1	3,85	3	11,53
<i>A. baumannii</i>	2	7,69	-	-	-	-	-	-	2	7,69
<i>S. maltophilia</i>	-	-	1	3,85	1	3,85	-	-	2	7,69
Total	5	19,24	7	26,93	8	30,77	6	23,08	26	100,00

En este caso las pozas presentaron un pH alcalino, evidenciándose así la diversidad de microorganismos capaces de vivir en este ambiente, encontrándose *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, y *Stenotrophomonas* sp. En cuanto a la temperatura de las pozas en estudio fue de 34°C, considerándose mesófilas y evidenciándose la presencia de bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos.

El género *Pseudomonas* es muy ubicuo y se encuentra en ambientes acuáticos con pocos nutrientes, considerando a las especies encontradas en los sedimentos de estas pozas, como, *P. aeruginosa*, grupo *Stutzeri* CDC Vb-3, *P. mendocina*, población autóctona de manantiales meso e hipotermes. En estas aguas con menor temperatura también es frecuente la presencia de otros

bacilos Gram negativos como *Acinetobacter* sp, y *Stenotrophomona* sp; la presencia de estas especies puede indicar una escasa protección del manantial, aunque pueden colonizar ambientes acuáticos y encontrarse en aguas subterráneas no contaminadas por el hombre.

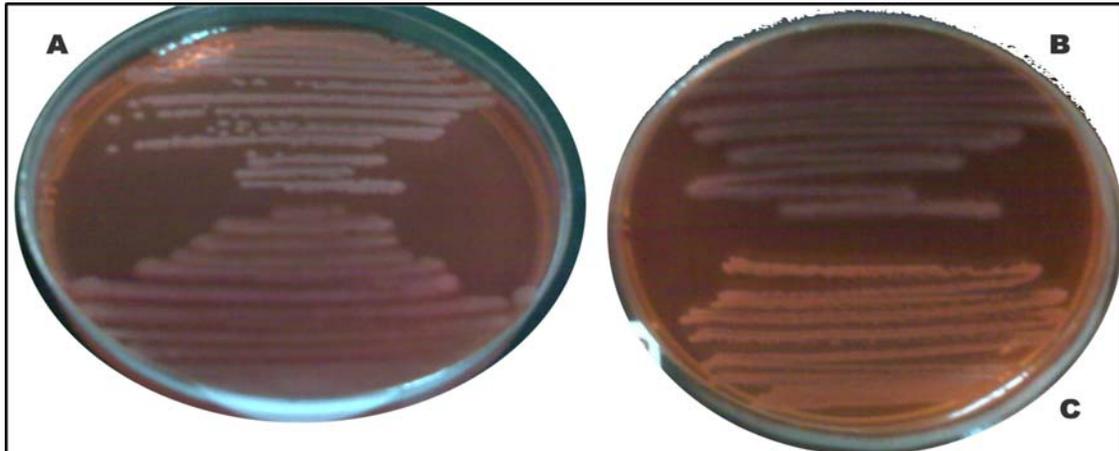


Figura 1: Producción de exopolisacáridos determinados a través del método rojo congo en cepas de *P.aeruginosa* provenientes de muestras de sedimentos de cuatro pozas de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010. Morfología típica de las colonias de *P. aeruginosa* por el método del agar rojo congo. A. cepa control positivo (*P. aeruginosa* ATCC 27853), B. colonias blancas (formadoras de biopelículas), C. colonias rojas (no formadoras de biopelículas).

El crecimiento de las colonias blancas en el agar rojo congo sugiere un incremento en la producción de exopolisacáridos, lo que previene la toma del colorante debido a que es la célula bacteriana que se une al indicador y no la matriz exopolisacárida (Chung *et al.*, 2003).

En el caso de *P. aeruginosa* la prueba del agar rojo congo constituye un marcador indirecto de la virulencia, en este caso, las cepas de mayor virulencia son precisamente las que no son capaces de absorber el colorante ya que la capa de exopolisacárido las recubre, esta capa es la que confiere un alto grado de virulencia debido a que le permite crecer, tanto en tejidos vivos, como en medios inertes (Costerton, 1999).

La tabla 3 muestra la presencia de exopolisacáridos en los BGNNF para la formación de la biopelícula aplicando la técnica del rojo congo, donde se pudo observar que de las 26 cepas estudiadas, 21 (80,77%) resultaron ser rojo congo positivo, evidenciándose colonias incoloras, lo que indica la producción del exopolisacárido, el cual no se une con el colorante, y 5 (19,23%) de las cepas fueron rojo congo negativo mostrando colonias rojas, lo que significa la ausencia del exopolisacárido.

Las 5 (100,00%) cepas de *P. aeruginosa* aisladas resultaron ser rojo congo positivo al igual que las 4 (100,00%) cepas de *P. mendocina*, 4 (100,00%) cepas de *P. pseudoalcaligenes*, 2 (100,00%) cepas *A. baumannii* y 2 (100,00%) cepas *S. maltophilia*; es importante resaltar que de las cepas del grupo *Stutzeri* CDC Vb-3 aisladas se presentaron 3 (60,00%) rojo congo positivo y 2 (40,00%) rojo congo negativo y las cepas aisladas *P. stutzeri* 3 (100,00%) resultaron ser rojo congo negativo.

La determinación de la presencia de exopolisacáridos a través de la siembra de las cepas en estudio en agar rojo congo permite evidenciar la capacidad de la célula de formar biopelícula. La producción de exopolisacáridos es considerado un importante factor de virulencia en las especies bacterianas, debido a que éstas tienen la capacidad de producir esta matriz que es la que interactúa con el medio externo (Callicó *et al.*, 2003).

La gran mayoría de los microorganismos se desarrollan formando biopelículas, pues en la naturaleza la vida microbiana está estructurada como una asociación en lugar de células planctónicas u organismos flotando libremente. En este estudio se pudo observar que el 80,77% resultaron ser rojo congo positivo, lo que indica la producción de la matriz de exopolisacáridos para la formación de biopelículas que confieren a las cepas protección, viabilidad celular y la comunicación

célula-célula, además de ser un factor de virulencia.

Tabla 3. Comportamiento de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) frente a la técnica del rojo congo para la detección de la formación de biopelículas, en cuatro pozas de las aguas termales ubicadas en el balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010

Microorganismo	Cultivo en rojo congo	Poza 1		Poza 2		Poza 3		Poza 4		Total	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>P. aeruginosa</i>	(+)	-		3	60,0	2	40,0	-		5	100,0
	(-)	-		-		-		-		-	
<i>Grupo Stutzeri CDC Vb-3</i>	(+)	-		1	20,0	1	20,0	1	20,0	3	60,0
	(-)	1	20,0	-		1	20,0	-		2	40,0
<i>P. mendocina</i>	(+)	-		1	20,0	2	40,0	2	40,0	5	100,0
	(-)	-		-		-		-		-	
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	(+)	1	25,0	1	25,0	-		2	50,0	4	100,0
	(-)	-		-		-		-		-	
<i>P. stutzeri</i>	(+)	-		-		-		-		-	
	(-)	1	33,3	-		1	33,3	1	33,3	3	100,0
<i>A. baumannii</i>	(+)	2	100,0	-		-		-		2	100,0
	(-)	-		-		-		-		-	
<i>S. maltophilia</i>	(+)	-		1	50,0	1	50,0	-		2	100,0
	(-)	-		-		-		-		-	

El 19,23% de las cepas no fueron capaces de formar biopelículas, esto puede deberse a diversos factores ambientales que afectan el proceso de formación de estas biocapas, como: el flujo de líquido, la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno (Kraigsley *et al.*, 2002). Sin embargo, existen una serie de factores genéticos, entre estos la presencia de adhesinas que funcionan durante el apego inicial a un sustrato, en el caso de

las cepas de *P. stutzeri*, estas presentan pili tipo IV que le confieren movilidad de forma críspar (un movimiento basado en la extensión bacteriana pilus / retracción) esto dificulta la adherencia bacteriana a superficies (Sikorski *et al.*, 1998).

Con relación a la prueba de agregación salina (SAT), resultaron positivas a esta prueba las 26 cepas (100,00%), en 24 (92,30%) de las cepas se pudo observar la agregación en todas las concentraciones utilizadas (0,5-2 mol.l⁻¹), las 2 (7,60%) cepas restantes de *A. baumannii* tuvieron valores intermedios (entre 1,5-2,0 mol.l⁻¹).

Lindaht *et al.*, 1981, utilizando el principio de la técnica de saltin out, describieron una técnica simple con la cual se puede medir la hidrofobicidad de la superficie celular, basado en la precipitación por sal. A mayor concentración de proteínas (adhesinas, pilis, fimbrias) se necesita menos concentración de sal para precipitar y hay mayor grado de hidrofobicidad. Gracias a los resultados obtenidos por estos autores se puede afirmar que la prueba de agregación salina (SAT) da una estimación indirecta sobre la presencia de adhesión en la superficie celular, siendo ésta la primera etapa de la formación de biopelículas. Posterior a éstos, muchos autores han usado ésta técnica ya que es simple y sencilla.

Se ha demostrado que cepas de *Escherichia coli* entero patogénicas y de *Salmonella typhi* poseen alta superficie hidrofóbica; característica dada por la presencia de pilis y otras adhesinas, por lo que la determinación de esta propiedad puede dar idea del grado de adhesión de las bacterias (Lindhal *et al.*, 1981; Megraud, 1986). En este trabajo más de 90,00 % de las cepas resultaron ser hidrofóbicas, lo que concuerda con los hallazgos obtenidos por Hostaka *et al.*, 2002; algunos autores han sugerido que las cepas de origen ambiental son más fimbriadas que las de origen fecal, por lo tanto tendrán mayor superficie hidrofóbica, afianzando ese hecho los resultados obtenidos en este trabajo (Fernández *et al.*, 1995).

En la tabla 4 se observa el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii* obtenidas, a través del método de Bauer *et al.* (1966). Las cepas mostraron 77,77% de sensibilidad a gentamicina, tobramicina, piperaciclina, ceftazidime, ciprofloxacina, imipenen y polimixina B. Sin embargo, se obtuvieron 2 (22,22%) cepas de *P. aeruginosa* resistentes al antimicrobiano meropenen. En el manual de CLSI los lineamientos establecidos para susceptibilidad son sólo para bacterias provenientes de muestras clínicas y no para bacterias de muestras ambientales, como las tratadas en este trabajo, sin embargo, fueron tomados como referencia en el caso de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y *A. baumannii*.

Para los antibióticos gentamicina, tobramicina, piperaciclina, ceftazidima, ciprofloxacina, imipenen y polimixina B, 7 (77,77%) de las cepas estudiadas resultaron ser sensibles a éstos, mientras que para meropenen 2 (22,22%) resultaron ser resistentes.

Tabla 4. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y *A. baumannii*, provenientes de los sedimentos de las márgenes de las aguas termales del balneario turístico “Aguas de Moisés” municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010

Antimicrobiano	Cepas		Cepas	
	Sensibles	(%)	Resistente	(%)
Gentamicina	9	100,00	0,0	0,00
Tobramicina	9	100,00	0,0	0,00
Piperaciclina	9	100,00	0,0	0,00
Ceftacidima	9	100,00	0,0	0,00
Ciprofloxacina	9	100,00	0,0	0,00
Meropenen	7	77,77	2,0	22,22
Imipenen	9	100,00	0,0	0,00
Polimixina B	9	100,00	0,0	0,00

Las cepas estudiadas presentaron un alto porcentaje de sensibilidad a los

antimicrobianos empleados, esto puede deberse a la procedencia de éstas, ya que son de origen ambiental.

La resistencia mostrada por las cepas de *P. aeruginosa*, frente al meropenem, puede deberse a la presencia de mecanismos de resistencia como el aumento de la expulsión del antibiótico mediado por la activación de bombas de reflujo, las cuales son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos; la expresión de estas bombas puede ser permanente o intermitente (Suárez *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Se aislaron 37,14% cepas de BGNNF en las muestras de sedimento en las márgenes de las aguas termales “Aguas de Moisés” del estado Sucre, municipio Ribero.

P. aeruginosa, *P. mendocina* y el grupo *Stutzeri* CDC Vb-3 fueron las cepas con mayor aislamiento entre los BGNNF.

El 90,00% de las cepas presentaron un alto grado de hidrofobicidad a través de la prueba de agregación salina, indicando esto la presencia de adhesión en la superficie celular.

80,77% de las cepas en estudio resultaron positivas a la prueba del rojo congo, lo que indica la producción de exopolisacáridos.

Las cepas de *P. aeruginosa* 3 (42,85%), *A. baumannii* 2 (28,57%) y *S. maltophilia* 2 (28,57%) mostraron un alto porcentaje de sensibilidad a los antimicrobianos probados, excepto dos (2) aislados de *P. aeruginosa*, las cuales presentaron resistencia a meropenem.

RECOMENDACIONES

Evaluar estrategias para aplicar las medidas necesarias, que permitan combatir la contaminación y eliminar la proliferación de bacterias que causan daños al ser humano.

Determinar factores de virulencia en las cepas productoras de exopolisacáridos, con el propósito de definir su empleo en biorremediación así como para evaluar el riesgo a la salud.

BIBLIOGRAFÍA

Anderl, J.; Franklin, M. y Stewart, P. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44: 1818-1824.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por método estandarizado. *American journal and clinical pathology*, 45: 493-496.

Bodey, G.; Bolivar, R.; Fainstein, V. y Jadeja, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases*, 5: 279-313.

Callicó, A.; Cedre, B.; Sifontes, S.; Torres, V.; Pino, Y.; Collís, A. y Esnard, S. 2003. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. *Vacci monitor*, 13 (3): 1-9.

Chole, R. y Faddis, B. 2003. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Archives otolaryngology - head y neck surgery*, 129: 634-636.

Chug, J.; Altman, E.; Berevidge, T. y Speert, D. 2003. Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: implication in exopolisaccharide production, pilus expression, persistence in the mouse. *Infectious immunology*, 71 (2): 904-909.

Clinical and laboratory standards institute. 2009. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing. *Ninetennth informational supplement*. Document M100-S19. Wayne, Pennsylvania, 29 (3): 38-43.

Costerton, J. 1999. Introduction to biofilms. *International journal antimicrobial agents*, 11: 217-221.

Davey, M. y O'Toole, G. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64: 847-867.

Davies, D.; Parsek, M.; Pearson, J.; Iglewski, B.; Costerton, J. y Greenberg, E. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280: 295-298.

Donlan R. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8 (9): 881-890.

- Donlan, R. y Costerton, J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15: 167-193.
- Fernández, A.; Pérez, M.; Rodríguez, L. y Nieto, T. 1995. Surface Phenotypic characteristics and virulence of spanish isolates of *Aeromonas salmonicida* after passage through fish. *Suppl enviromental microbiology*, 61: 2010-2012.
- Fernández, R. 2008. Moisés y sus aguas garantizan diversión y relax. <<http://enoriente.com/sitios-de-interes-magazine-149/sucre-magazine-150/5108-moisy-sus-aguas-garantizan-diversi-relax>> (20/12/2009).
- Finegold, S. y Baron, E. 1992. *Diagnóstico microbiológico*. Séptima edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Hardalo, C. y Edberg, S. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Critical reviews in microbiology*, 23: 47-75.
- Hassett, D.; Ma, J.; Elkins, J.; McDermott, T.; Ochsner, U. y West, S. 1999. Quorum-sensing in *pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular microbiology*, 34: 1082-1093.
- Hostaka, A.; Ciznar, I. y Krovacecekk, J. 2002. Potencial associate properties of environmental *Plesiomonas shigelloides* strains in: Symposium the *Aeromonas* and *Plesiomonas*. España.
- Hucker, G. y Conn, H. 1923. Methods for gramstainnig. *Technique bulletin*, 93 (5): 1-37.
- Koneman, E.; Allens, S.; Dowell, V.; Janda, W. y Winn, W. 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. editorial médica panamericana. Buenos Aires.
- Kraigsley, A., Ronney, P. y Finger, S. 2002. "Hydrodynamic influences biofilm formationandgrowht". <[hptt:// carambola. Usc edu/ researh/biophysics/biofilms y Web.html](http://carambola.usc.edu/research/biophysics/biofilms_y_Web.html)>.
- Lindhal, M.; Faris, A.; Wadstrom, T. y Hysten, S. 1981. A new test based on "Salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochimica et biophysica*, 677: 471-476.
- Mandell, G.; Bennett, J. y Dolin, R. 2000. *Principles and practice of infectious diseases*. Fifth edición. Panamericana. Estados Unidos.
- McCarthy, M. 2001. Breaking up the bacterial happy home. *Lance*, 23 (357): 2032-2033.
- Megraud, F. 1986. Incidence and virulence of *Aeromonas* species in feces of children with diarrhoea. *European journal of clinical microbiology*, 5: 311-316.

- Morales, P.; Sobal M.; Bonilla M.; Martínez W. y Martínez D. 2007. El centro de vinculación con el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles del colegio de postgraduados. México.
- Morton, R.; Hebel, J. y Mc Carter, R. 1993. Bioestadística y epidemiología. Tercera edición. Editorial Mac Graw-Hill. Mexico.
- Mosso, M.; De la Rosa, M.; Vivar, C. y Medina, M. 1994. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. *Journal of applied bacteriology*, 77: 370-381.
- Mulusky, D. 1974. *Ecology of estuaries*. Heineman educational books. London.
- O'Toole, G.; Kaplan, H. y Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual reviews of microbiology*, 54: 50-68.
- Pearson, J.; Pesci, E. y Iglewski, B. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of bacteriology*, 179: 5756-5767.
- Post, J.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. y Ehrlich, G. 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current opinion in otolaryngology y head and neck surgery*, 12: 185-190.
- Pumarola, A.; Rodríguez, A.; García, J. y Piedrola, G. 1992. *Microbiología y parasitología médica*. Segunda edición. Ediciones Messon Salvat. Barcelona, España.
- Ress, G. 1993. Health implications of sewage in coastal waters the british case. *Marine pollution bulletin*, 26 (1): 14-19.
- Rodríguez, M. 1997. Infecciones por *Pseudomonas* en una unidad de cuidados intensivos. *Reviews association mexican medical critical therapy intensive*, 11 (5): 136-140.
- Romero, J. y Salas, T. 1993. Estudio de frecuencias de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados aisladas en ambientes marinos. *Biotechnology and bioengineering*, 3 (4): 54-57.
- Sikorski, J.; Graupner, M. y Wackernagel, W. 1998. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Microbiology*, 144: 569-576.
- Stetter, K. 1996. Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiology reviews*, 18: 149-158.

- Stoodley, P.; Dodds, I. y Boyle, J. 1999. Lappin-Scout HM. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of applied microbiology*, 85: 518-519.
- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. y Costerton, J. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual reviews microbiology*, 56: 187-209.
- Suárez, C.; Catan, J.; Guzmán, A. y Villegas M. 2006. Mecanismo de Resistencia a carbapenemos en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter sp.* y estrategias para su prevención y control. *Asociación colombiana de infectología*, 2: 10-16.
- Taylor, P. 1993. The state of the marine environment: a critique of the work and role of the joint group of experts on scientific aspects of marine pollution (GESAMP). *Marine pollution bulletin*, 26 (3): 120-127.
- Thomas, J. y Nakaishi, L. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *The journal of the american dental association*, 137: 10-15.
- Vroom, J.; De Grauw, K. y Gerritsen, H. 1999. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two photon excitation microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 65: 3502-3511.
- Ward, D.; Ferris, M.; Nold, S. y Bateson, M. 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62 (4): 1353-1370.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	DETECCIÓN DE BIOPELÍCULA Y AGREGACIONES BACTERIANAS EN BACIOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES PRESENTES EN SEDIMENTOS DE AGUAS TERMALES. CARIACO, MUNICIPIO RIBERO, ESTADO SUCRE.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rivas Hernández Pierina Paola	CVLAC	16175450
	e-mail	pieripaola1604@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Biopelícula
Exopolisacárido
Hidrofobicidad
Bacilos Gram negativos no fermentadores

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOANALISIS

Resumen (abstract):

Con la finalidad de detectar biopelículas y agregaciones bacterianas en bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) presentes en sedimentos de aguas termales pertenecientes a las aguas de Moisés, Cariaco, municipio Ribero, estado Sucre, se realizó el presente trabajo de investigación, en el periodo comprendido entre octubre del año 2009 y enero del año 2010. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales; la presencia de biopelícula y agregación bacteriana se realizó mediante los métodos de rojo congo y agregación salina, respectivamente. Se realizó la prueba de susceptibilidad empleando el método de difusión en agar. De las bacterias aisladas, 36 (51,43%) pertenecieron a la familia *Enterobacteriaceae*, 8 (11,43%) aislados de cocos Gram positivos y 26 (37,14%) aislados de BGNNF; entre éstos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, grupo *Stutzeri* CDC Vb-3 fueron las bacterias más frecuentemente aisladas, en las pozas estudiadas. El 90,00% de las cepas estudiadas presentaron un alto grado de hidrofobicidad, indicando su capacidad de adhesión, necesitando bajas concentraciones de sales para precipitar. De las 26 cepas estudiadas, 21 (80,77%) resultaron ser rojo congo positivo y 5 (19,23%) fueron rojo congo negativo. Las cepas de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii* mostraron 100,00% de sensibilidad a los antimicrobianos empleados. Las cepas de BGNNF resultaron ser altamente hidrofóbicas, lo que les permite adherirse a superficies y favorece la formación de biofilm. De acuerdo a estos resultados, los BGNNF aislados son formadores de biopelículas lo que permite su colonización en diversos ambientes, estos pueden ser considerados como microorganismos con potencial de biorremediación de ambientes contaminados.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Araque Yasmina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.000.717
	e-mail	Yamasi40@gmail.com
	e-mail	
Antón Dina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.647.499
	e-mail	dinacar@hotmail.com
	e-mail	
Ponce Yusulbeht	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11.829.822
	e-mail	yusulbeht@yahoo.es
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	02	21

Lenguaje: spa _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-rivasp.doc	Application/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

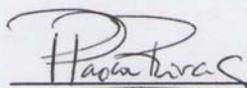
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

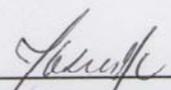
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

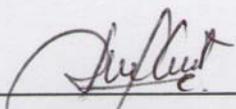
Yo **Pierina Paola Rivas Hernández CI. 16175450** autorizo a la **Universidad de Oriente** para que publique el presente trabajo de investigación con fines educativos.



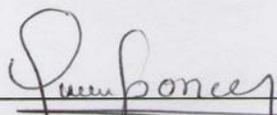
Pierina P. Rivas H.
AUTOR 1



Yasmina Araque
ASESOR



Dina Antón
JURADO 1



Yusulbeht Ponce
JURADO 2

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

