



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

FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *Pseudomonas* sp. PRODUCTORAS  
DE BIOPELÍCULAS, PROVENIENTES DE AGUAS Y SEDIMENTOS DEL  
BALNEARIO TURÍSTICO AGUAS DE MOISÉS  
(Modalidad: Tesis de Grado)

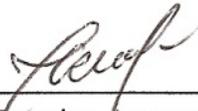
Edith Josefina Alfonzo González

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

CUMANÁ, 2012.

FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *Pseudomonas* sp. PRODUCTORAS  
DE BIOPELÍCULAS, PROVENIENTES DE AGUAS Y SEDIMENTOS DEL  
BALNEARIO TURÍSTICO AGUAS DE MOISÉS

APROBADO POR:



---

Dra. Yasmina Araque C.  
Asesora



---

MSc. Dina Antón  
Coasesora



## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
LISTA DE TABLAS .....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN .....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA .....	1
Descripción del área geográfica.....	6
Población en estudio .....	6
Recolección de las muestras .....	6
Muestras de sedimento.....	6
Muestras de agua .....	6
Dilución de la muestra de sedimento.....	7
Dilución de la muestra de agua.....	7
Caracterización morfológica de las colonias .....	7
Aislamiento.....	7
Caracterización microscópica de las colonias .....	7
Pruebas bioquímicas para la identificación de Pseudomonas sp. ....	8
Prueba de la oxidasa .....	8
Prueba de fermentación de azúcares (glucosa y lactosa).....	8
Motilidad.....	8
Descarboxilación de aminoácidos (lisina).....	9
Hidrólisis de la arginina.....	9
Hidrólisis de la urea .....	10
Hidrólisis de la esculina.....	10
Crecimiento 42°C.....	10
Susceptibilidad a la polimixina B .....	10
Determinación de la producción de exopolisacárido a través del método agar rojo congo (MRC) .....	11

Determinación de la producción de biopelículas mediante el método de dilución en microplacas .....	11
Determinación de factores de virulencia en aislados de Pseudomonas sp. ....	12
Determinación de la actividad ADNasa.....	12
Determinación de la actividad hemolítica .....	12
Determinación de la enzima gelatinasa .....	13
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para las cepas identificadas como Pseudomonas sp.....	13
Análisis estadístico .....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	1
CONCLUSIONES.....	25
RECOMENDACIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA .....	1
HOJAS DE METADATOS.....	42

## DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso y a mi Virgen del Valle, quienes me han dado siempre las fuerzas necesarias para alcanzar cada uno de mis sueños, logrando hoy uno de ellos.

Mis padres, quienes me han fortalecido para culminar con éxito esta etapa; especialmente a mi madre, mujer que a pesar de tantas adversidades, siempre mantuvo su dedicación incondicional, brindándome una palabra de aliento en el momento preciso.

Mi hermana, me enseñaste que debo tener perseverancia y vencer los obstáculos que se presenten en la vida, para alcanzar mis logros.

Mis abuelos, desde su morada santa, estoy segura que deben sentirse felices y orgullosos por la culminación de esta meta alcanzada. "Siempre estarán en mi corazón".

Mi tía, primas y primo político, quienes confiaron en mí y me transmitieron en todo momento sus energías positivas en los momentos más difíciles.

Mis princesas, Ambar y Simarys, quienes con sus inocencias, travesuras, dulzuras y alegrías, me hacían feliz esos momentos tan difíciles para mí.

Mis amigas Johana, Pierina, Yohanna y Stefany, por haberme dado la oportunidad de compartir con ustedes momentos maravillosos, y hacer posible que una dificultad se convierta en una sonrisa, estando presente cuando más las he necesitado.

Jesús Millán, Juan Martínez y Pedro Aguillón, quienes fueron una guía para impulsar este caminar y deben sentirse felices por la culminación de esta meta en mi vida.

A TODOS, LOS QUIERO MUCHÍSIMO.

## AGRADECIMIENTOS

A

La profesora Yasmina Araque, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, colaborando, guiándome, reforzando y alcanzando los conocimientos y herramientas necesarias para nutrirme profesionalmente.

Las profesoras Dina Antón y Yusulbeth Ponce, por su apoyo y colaboración en la culminación de este trabajo, logrando con éxito mi carrera universitaria.

Hospital tipo I Dr. David Espinoza Rojas, por haberme permitido realizar parte de las pasantías en su laboratorio, en especial a la licenciada Obdalis Alcalá y al licenciado Humberto Mora, quienes me orientaron cuando más lo necesité.

La licenciada Inés Rojas, Jefa del Laboratorio Clínico Santa Inés, quien me permitió cumplir pasantías profesionales, orientándome durante mi estadía, y así mismo reforzando los conocimientos adquiridos durante mi carrera universitaria.

Mis compañeras de laboratorio, Samia Small, María Figueras y Rita Loero, por compartir tantas experiencias y momentos agradables durante la realización de este trabajo.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diversidad de especies <i>Pseudomonas</i> sp. provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010. ....	15
Tabla 2. Comportamiento de <i>Pseudomonas</i> sp. en la producción de exopolisacárido, a través del método agar rojo congo, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010. ....	16
Tabla 3. Presencia de factores de virulencia: actividad ADNasa, actividad hemolítica, enzima gelatinasa, en aislados de <i>Pseudomonas</i> sp. productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010. ....	21
Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010....	22
Tabla 5. Tabla de contingencia en la asociación entre dos factores de virulencia: actividad hemolítica y producción de gelatinasa en aislados de <i>Pseudomonas</i> sp, productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de exopolisacárido determinado a través del método rojo congo en cepas de <i>Pseudomonas</i> sp. provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010. colonias productoras de exopolisacárido ( <i>P. aeruginosa</i> P1E34). .....	18
Figura 2. Producción de biopelículas en cepas de <i>Pseudomonas</i> sp. provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010, mediante el método de dilución en microplacas. ....	19
Este método es muy laborioso, requiere preparaciones previas de las cepas; no obstante, mediante esta técnica se puede evaluar la capacidad de los aislados bacterianos de formar biopelículas, así como también, cuantificar la cantidad de la misma que una bacteria es capaz de producir. ....	19

## RESUMEN

Con el propósito de detectar la presencia de factores de virulencia en aislados de *Pseudomonas* sp. productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, se llevó a cabo el presente trabajo, en el período comprendido entre octubre del año 2009 - enero del 2010. La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas convencionales, empleadas para bacilos Gram negativos no fermentadores. La producción de exopolisacárido (alginate), se realizó a través del método rojo congo y la producción de biopelículas, por el método de dilución en microplacas; la detección de enzimas extracelulares (ADNasa, hemolisina y gelatinasa) se determinaron por el método de estrías por agotamiento en la superficie de cada uno de los medios específicos: agar ADNasa, agar sangre y agar gelatina, respectivamente. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión en agar, siguiendo los lineamientos establecidos por el CLSI (2011). En 19 (90,48%) de las 21 cepas aisladas, se detectó la presencia de exopolisacárido, mientras que, 2 (9,52%) cepas de *Pseudomonas stutzeri*, resultaron ser rojo congo negativo (no presentaron exopolisacárido). Por el método de dilución en microplacas, todas las cepas de *Pseudomonas* sp. fueron productoras débiles de biopelículas. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, fueron las especies que presentaron mayor positividad a los factores de virulencia estudiados, seguido de *Pseudomonas stutzeri*. De las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudiadas, 7 (57,14%) presentaron sensibilidad a los antimicrobianos utilizados, mientras que 3 (42,86%) de ellas, mostraron resistencia al meropenem. De acuerdo a estos resultados, todas las cepas, tanto sensibles como resistentes al antibiótico empleado, son productoras de biopelículas, lo que permite su colonización en diversos ambientes. Se han descrito numerosos factores de virulencia asociados a las especies del género *Pseudomonas*, siendo la enzima hemolisina el factor que mas prevalece en las cepas estudiadas.

## INTRODUCCIÓN

Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) son un grupo de microorganismos aerobios, no esporulados, que o bien no utilizan hidratos de carbono como fuente de energía o los degradan a través de la vía oxidativa y no fermentativa (Koneman *et al.*, 2008). Estos microorganismos son ubicuos y se encuentran en todos los hábitats terrestres, son los más abundantes del planeta, crecen en el suelo, manantiales calientes, en las profundidades del mar y en la corteza terrestre; su infectividad a nivel clínico y hospitalario se debe a un estado de alteración o debilitamiento del hospedero, causado por el uso indiscriminado de medicamentos o debido a prolongados procedimientos quirúrgicos (Fredrickson y Zachara, 2004).

En la actualidad, los BGNNF se encuentran agrupados en diferentes familias: *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Oligellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Oxalobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Cytophagaceae*, *Brucellaceae*, *Moraxellaceae*, *Methylbacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Shewanellaceae*, siendo los géneros de mayor importancia clínica *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* (Balows *et al.*, 2007).

Los bacilos en *Pseudomonas* sp. son rectos o ligeramente curvos, aerobios estrictos; la mayoría de las cepas son móviles, por medio de uno o varios flagelos polares; usualmente, oxidasa positiva, utilizan la glucosa y otros hidratos de carbono oxidativamente. Algunas *Pseudomonas* producen pigmentos solubles en agua, soportan una gama muy variada de condiciones adversas, como temperaturas elevadas y son capaces de crecer entre 4 y 42°C (Koneman *et al.*, 2008).

La virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* es multifactorial y es el producto de la interacción de muchas variables que involucran tanto a la bacteria como al hospedador. De igual forma, produce un elevado número de toxinas y tiene en su superficie diversos componentes que lo hacen especialmente virulento, comparado con otros microorganismos. La patogenicidad o virulencia de esta bacteria se ha asociado con numerosos factores, algunos son parte estructural de la célula y otros son sintetizados por ella y excretados al tejido circundante donde se desarrolla la infección, los cuales utilizan los microorganismos para dañar al hospedero. Entre los factores de virulencia se encuentran: aquellos que dañan al hospedero (exotoxinas, enzimas hidrolíticas, y endotoxinas) y productos bacterianos que desencadenan una respuesta autoinmune (Shaver y Hauser, 2004).

Los factores de virulencia, de un organismo, son moléculas producidas por un patógeno que influyen específicamente en las funciones del hospedero, para permitir al patógeno crecer (Gandón, 2002). Para que un microorganismo patógeno logre producir enfermedad en un individuo, aparte de las características del hospedero, que favorezcan o no la instalación del cuadro infeccioso, la bacteria debe poseer una serie de factores de virulencia que sean capaces de vencer las defensas del hospedero. Se ha demostrado que

estos determinantes de virulencia participan en la etapa de colonización y supervivencia bacteriana, la invasión tisular y daños en los tejidos del hospedero (Salazar y González, 2002).

Se han descrito numerosos factores de virulencia en la estructura celular de *Pseudomonas aeruginosa*, entre los que se pueden mencionar: antígenos somático O y flagelares H, fimbrias y cápsula de polisacáridos, producción de enzimas extracelulares (ADNasa, gelatinasa, proteasas, elastasa, lecitinasa y dos hemolisinas, fosfolipasa C termolábil y un lipopolisacárido termoestable) (Salazar y González, 2002; Koneman *et al.*, 2008).

*Pseudomonas aeruginosa* presenta una extraordinaria versatilidad metabólica, tanto en ambientes naturales como intrahospitalarios, capaces de habitar un amplio rango de nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos. De igual forma, su capacidad para explorar una amplia variedad de nutrientes, refleja un sistema de adaptación al medio ambiente para resistir a condiciones adversas, mostrando una alta capacidad de reacción a señales físico-químicos y biológicas. Estos microorganismos son claves en el reciclado de materia orgánica y juegan un papel esencial en la mejora y en el mantenimiento de la calidad del medio ambiente (Madigan y Martinko, 2005).

Las especies de *Pseudomonas* son capaces de secretar diferentes enzimas y exotoxinas, dentro de las que se pueden mencionar: elastasas y proteasas que facilitan la invasión, ayudadas por las hemolisinas (sobre todo, la fosfolipasa C), que causan una lesión de la membrana de las células tisulares. Dentro de las proteínas que intervienen en la infección por este género bacteriano se encuentran las exotoxinas A y S, que son los factores de virulencia más importantes, las cuales ejercen un papel inmunosupresor sobre los linfocitos B y T humanos, mediando la fijación bacteriana a las células del hospedador e influyen negativamente en la biosíntesis de las proteínas y causan necrosis tisular (Takumida y Anniko, 2006).

Algunas especies del género *Pseudomonas* representan una amenaza para la salud del hombre; sin embargo, pueden ser útiles en el tratamiento de la contaminación ambiental, debido a las diversas aplicaciones biotecnológicas que tienen sobre los ecosistemas, favorables en la limpieza de suelos y aguas contaminadas (Maier y Soberón, 2000).

Por su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas, algunas especies del género *Pseudomonas* se comportan como patógenos oportunistas eficaces, debido a su gran potencial metabólico y mecanismos de virulencia. Su papel como patógenos responsables de infecciones comunitarias e intrahospitalarias crean un problema al momento de la elección del antimicrobiano más adecuado. Esto se debe a que posee una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos y a una extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, principalmente, debido a mutaciones (Jorgensen y Halling, 2000).

La resistencia natural de las bacterias a los antimicrobianos se presenta ante una necesidad de sobrevivir en un ambiente hostil, al perturbar el balance de los microorganismos en el medio ambiente, ocasionando que las bacterias, tanto patógenas como no patógenas, reemplacen a microorganismos sensibles; como consecuencia, diversos microorganismos resistentes han sido aislados de aguas subterráneas, suelos y lagunas de tratamiento, por lo que se afirma que la resistencia antibiótica está ampliamente diseminada en el medio ambiente (Lipsitch y Samoret, 2002).

En el medio ambiente, las bacterias no se encuentran en una forma unicelular, planctónica o libre, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se encuentran adheridas a las superficies inertes o vivas en forma de biopelículas (biofilms), afectando al medio ambiente, donde se incluye el ambiente intrahospitalario. La virulencia de una bacteria está también relacionada con la producción de las biopelículas, la cual le confiere resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero e impide la penetración efectiva de antibióticos y fagocitación (Donlan, 2002).

El término biopelícula hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran embebidos en una matriz, principalmente de naturaleza polisacárida, o agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75%) que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas y con diferentes requerimientos metabólicos, así mismo, forman una multitud de canales que facilitan la difusión de nutrientes y, por donde circulan agua, enzimas, nutrientes, y residuos. Allí las células establecen relaciones y dependencias: viven, cooperan y se comunican a través de señales químicas (quorum sensing), que regulan la expresión de genes de manera diferente en las distintas partes de la comunidad, como un tejido en un organismo multicelular (Branda *et al.*, 2005).

El proceso de formación de biopelícula está regulado por un proceso de quorum sensing o autoinducción. El sistema de quorum sensing es un mecanismo utilizado por algunos bacilos Gram negativos para comunicarse entre sí los diferentes microorganismos de una población; es la manera que tienen de adaptarse al medio y de ejercer su patogenicidad de forma coordinada. Consiste en que el microorganismo secreta una sustancia que se denomina autoinductor y que atraviesa la membrana celular fácilmente (por difusión o por transporte activo). Cuando se alcanza una concentración determinada (dependiente de la población que exista), esta sustancia se une a un activador transcripcional que codifica a unos determinados genes que, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, regularán la producción y excreción de factores de virulencia del microorganismo o de sustancias que intervienen en la formación de biopelículas (Iglewski y Smith, 2003).

En bacterias Gram negativas, el principal autoinductor es la acilhomoserina lactona, mientras que, en bacterias Gram positivas el autoinductor es un péptido. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos (Wu *et al.*, 2004).

La presencia de biopelículas en el medio ambiente responde a la formación de una compleja red de células, en la que el agua es el componente mayoritario junto con la existencia de nutrientes. La capacidad de formación de biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas (Marsh, 2005).

El agua proporciona un ambiente que favorece la diversidad microbiana, la cual depende también de diferentes factores como la disponibilidad y concentración de nutrientes. Las fuentes de agua dulce constituyen una pequeña parte de toda el agua del planeta, cuya contaminación de aguas superficiales y/o subterráneas por residuos domésticos e industriales, causan problemas ambientales y favorece al desarrollo de microorganismos patógenos u oportunistas (Prescott *et al.*, 2002).

La presencia en el agua de agentes patógenos para el hombre es producto de una inadecuada utilización de estas fuentes por parte del ser humano, lo que ocasiona serios problemas al medio ambiente y a la manifestación de enfermedades infecciosas en el individuo (Romero y Salas, 1993).

Las fuentes de aguas termales empleadas con fines recreacionales o domésticas, pueden ser contaminadas por la existencia de ciertas bacterias patógenas: *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, así como otras bacterias oportunistas: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., entre otras, constituyen una amenaza grave para la salud de la población (Prescott *et al.*, 2002).

Las aguas termales o mineromedicinales emergen espontáneamente del seno de la tierra y sus características físicas y/o químicas, pueden ejercer efectos terapéuticos, aliviando o restaurando la salud de las personas; así mismo, estas aguas naturales, bien sean superficiales o profundas, debido a su propia mineralización y muchas veces a sus elevadas temperaturas, no constituyen un medio adecuado para el desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, las aguas minerales, así como cualquier ambiente acuático natural poseen una población microbiana autóctona que suele ser característica de cada tipo de agua y que depende de sus propiedades físicoquímicas (Urbani, 1991).

A nivel regional, se realizó un estudio en cepas de origen ambiental, sobre la determinación de la producción de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de muestras de sedimentos de las márgenes del río Manzanares de la ciudad de Cumaná, estado Sucre (González, 2010), demostrando la capacidad de las cepas bacterianas de formar biopelículas para adaptarse y sobrevivir a un determinado ambiente. Por otro lado, se detectaron biopelículas y agregaciones bacterianas en bacilos Gram negativos no fermentadores presentes en sedimentos de aguas termales, Cariaco, municipio Ribero, estado Sucre (Rivas, 2011), demostrando que los BGNNF aislados son formadores de biopelículas, lo que permite su colonización en diversos ambientes,

éstos pueden ser considerados como microorganismos con un gran potencial de biorremediación de ambientes contaminados, de igual manera, estos microorganismos presentaron una alta capacidad hidrofóbica, permitiendo la adherencia de los mismos a superficies, lo que favorece la formación de biopelículas.

El estado Sucre posee una riqueza natural y cultural que lo hace un destino turístico por excelencia, a través de la historia, han existido diferentes centros turísticos tipo balneario, tales como: Poza Azul, Poza Cristal, Poza Paraíso, El Níspero, Los Cocoteros, entre otras. Uno de estos centros recreacionales es el balneario turístico Aguas de Moisés, el cual comprende una extensión de, aproximadamente, 180 hectáreas, a orillas de la Laguna de Buena Vista; el mismo es alimentado por los manantiales que allí surgen, donde se observan cristalinas aguas, ricas en calcio, potasio y otros elementos. Geográficamente, se encuentra ubicado en el sector Río Azul, asentamiento campesino Pantoño, Municipio Ribero (Fernández, 2008).

Es importante resaltar que la presencia de *Pseudomonas* sp., en las aguas objeto de estudio, implica un riesgo de contaminación para el usuario, debido a que, por su condición de patógeno oportunista, podría ser capaz de producir infecciones en el humano. Sin embargo, estos microorganismos pueden colonizar ambientes acuáticos y encontrarse en aguas no contaminadas por el hombre. Por esta razón, se evaluó la presencia de bacterias productoras de biopelículas, así como también, se determinaron algunos factores de virulencia de éstas cepas bacterianas, con el fin de definir su empleo con fines biotecnológicos con el mínimo de riesgos, sin que ocasione daño al ecosistema y a la salud de los individuos.

## **METODOLOGÍA**

### **Descripción del área geográfica**

El presente estudio se llevó a cabo en el balneario turístico Aguas de Moisés, ubicado a orillas de la Laguna de Buena Vista, dichas aguas termales se encuentran alimentadas por los manantiales que allí surgen, formando variedades de fuentes naturales. Se localiza en el sector Río Azul, asentamiento campesino Pantoño, vía Cariaco/Casanay, estado Sucre, Venezuela (Fernández, 2008).

### **Población en estudio**

En el periodo comprendido entre octubre de 2009 - enero de 2010, se realizaron 3 muestreos, recolectando 2 muestras de sedimentos y 2 muestras de aguas en cada una de las siguientes pozas (piscina cascada Abraham, piscina Bella Vista Playa, piscina Isla Palma Sola y piscina Moisés), pertenecientes al balneario turístico Aguas de Moisés.

### **Recolección de las muestras**

#### Muestras de sedimento

Se realizaron tres (3) muestreos de sedimento por duplicado, tomadas en cuatro pozas diferentes de las Aguas de Moisés (piscina cascada Abraham, piscina Bella Vista Playa, piscina Isla Palma Sola y piscina Moisés). Las muestras de sedimento se obtuvieron de las orillas de cada una de las pozas en estudio, se recolectaron, aproximadamente, 100 g, en envases plásticos, debidamente estériles. Posteriormente, se transportaron al Laboratorio de Investigación Bacteriológica del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, a temperatura ambiente y en aerobiosis para mantener inalterables las condiciones de vida de los microorganismos existentes.

#### Muestras de agua

La recolección de las muestras de agua se realizaron en cuatro pozas diferentes de las Aguas de Moisés (piscina cascada Abraham, piscina Bella Vista Playa, piscina Isla Palma Sola y piscina Moisés); se recolectaron, aproximadamente, 100 ml de agua, en recipientes de vidrio, debidamente estériles, de boca ancha, de rosca y capacidad de 300 ml. El envase se sostuvo por la base y fue sumergido de la superficie del agua unos 20 a 30 cm de profundidad, una vez que fue recolectada la cantidad de agua necesaria se procedió a cerrar el recipiente cuando aún estaba dentro del agua. Durante el proceso de muestreo se llevó a cabo la medición del pH y de la temperatura de las aguas de cada uno de los sitios de recolección, siguiendo los lineamientos de la Comisión Venezolana

de Normas Industriales (COVENIN, 2002).

Posteriormente, estas muestras de agua se transportaron al Laboratorio antes mencionado y en iguales condiciones que las muestras de sedimento.

### **Dilución de la muestra de sedimento**

Se pesó 1 g de sedimento por muestra tomada, el cual se diluyó en un tubo de ensayo con 9 ml de Solución Salina Fisiológica Estéril, con el fin de disolver las bacterias presentes en las partículas de sedimentos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  en caldo nutritivo, luego, a partir de la dilución  $10^{-3}$ , se trasladó 1 ml de las respectivas diluciones a placas de Petri estériles, a las cuales se le añadieron 15 ml de agar nutritivo fundido, se mezclaron y se dejaron solidificando. Luego, todas las placas fueron incubadas a temperatura adecuada, en ambiente de aerobiosis durante 24 horas y se estimó el conteo total de aerobios mesófilos, así como la variedad de colonias presentes en el medio (Hagedorn *et al.*, 1987).

### **Dilución de la muestra de agua**

Una vez obtenidas las muestras de agua, provenientes de las diferentes pozas de las Aguas de Moisés, se les realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  en agua estéril; posteriormente, a partir de la dilución  $10^{-3}$  se trasladó 1 ml de las respectivas diluciones a placas de Petri, a las cuales, posteriormente se les añadieron 15 ml de agar nutritivo fundido. Luego, todas las placas sembradas fueron incubadas a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , en ambiente de aerobiosis, durante 24 horas, y se estimó el conteo total de aerobios mesófilos (Mulusky, 1974).

### **Caracterización morfológica de las colonias**

Una vez transcurrido el período de incubación, se realizó la observación morfológica de las colonias bacterianas en las placas de cultivo, donde se visualizaron todas las colonias aisladas y las mismas fueron seleccionadas en base a: consistencia, aspecto, tamaño, forma y producción o no de pigmento.

### **Aislamiento**

Las colonias seleccionadas, en base a las características del género a estudiar, fueron cultivadas nuevamente en agar nutritivo y agar MacConkey, para la obtención de colonias puras; las mismas fueron incubadas desde 24 hasta 72 horas, dependiendo del crecimiento óptimo, a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , en ambiente de aerobiosis (Prescott *et al.*, 2002).

### **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.

### **Pruebas bioquímicas para la identificación de *Pseudomonas* sp.**

Las pruebas correspondientes se realizaron a partir de colonias purificadas en agar MacConkey. Para la identificación bioquímica de las colonias seleccionadas, se emplearon los esquemas y procedimientos para BGNNF, descritos por Koneman *et al.* (2008) y MacFaddin (2002), los cuales se señalan a continuación:

#### Prueba de la oxidasa

Las bacterias productoras de la enzima citocromo oxidasa en presencia de oxígeno molecular, producen un compuesto de color intenso denominado azul de indofenol, debido a la oxidación del reactivo tetrametil p-fenilendiamina.

Para la realización de esta prueba, se tomó con un palillo de madera una colonia procedente de agar nutritivo, se colocó sobre un trozo de papel de filtro, previamente impregnado con el reactivo tetrametil p-fenilendiamina (reactivo incoloro en su forma reducida). La ausencia de color al cabo de 5 seg, en el lugar donde se colocó la colonia, indicó una reacción negativa, y la presencia de color púrpura indicó que se trataba de bacterias oxidasa positivas.

#### Prueba de fermentación de azúcares (glucosa y lactosa)

Este medio de cultivo diferencial, sirvió para la identificación de bacterias Gram negativas, en base a la capacidad que tiene un microorganismo de utilizar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de desarrollo basal, con la producción de gas o sin ella, junto con la determinación de la posible producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S).

En tubos con el medio de cultivo agar Kligler, solidificado en bisel, se procedió a realizar la siembra por punción y estría de la colonia. Se dejó incubando a 37°C durante 24 a 96 horas, la falta de producción de ácido en este medio, se manifestó por la presencia de un color rojo (alcalino) tanto en el pico de flauta como en la profundidad del tubo, y la presencia de un color amarillo (acidificación) en el medio, indicó que se trata de bacterias fermentadoras. Las cepas sugestivas de BGNNF se reconocieron por la falta de producción de ácido, es decir, no hubo fermentación de ninguno de los carbohidratos.

#### Motilidad

Esta prueba se realizó en agar motilidad, la cual determina la capacidad móvil por parte

de los microorganismos, para lo cual se procedió a inocular la colonia sospechosa en el medio semisólido y se incubaron a 37°C, durante 24 a 96 horas.

La interpretación de la capacidad móvil por parte de los microorganismos se realizó por medio del examen macroscópico del medio en busca de una zona difusa de crecimiento que se ensanchó a partir de la línea de inoculación. Por lo tanto, la presencia de una pequeña zona de turbidez en la parte superior del medio inoculado indicó un resultado positivo.

Prueba de utilización de carbohidratos reacción Hugh- Leifson O/F para no fermentadores (glucosa, maltosa, manitol y sacarosa)

Esta reacción demuestra la vía de utilización de los carbohidratos por parte de las bacterias, la cual puede ser oxidativa, fermentativa o ambas. La diferenciación fundamental entre el metabolismo oxidativo y fermentativo de un hidrato de carbono, depende de los requerimientos de oxígeno atmosférico y de la fosforilación inicial. En virtud de lo anterior, esta reacción fue utilizada para diferenciar bacterias aerobias de los anaerobios y anaerobios facultativos. Este medio se inoculó sembrando 2 tubos por cada cepa para cada carbohidrato utilizado: glucosa, maltosa, manitol y xilosa, de los cuales uno se cubrió con parafina líquida, incubándose a 37°C durante 24 a 96 horas. El metabolismo de *Pseudomonas* sp., degrada los carbohidratos por la vía oxidativa, evidenciándose por el cambio de indicador de verde a amarillo en la parte superior del tubo; mientras que, los tubos a los que se les añadió parafina, permanecieron sin cambio de color del indicador del medio.

Descarboxilación de aminoácidos (lisina)

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas sustrato específicas capaces de reaccionar con la porción carboxilo de los aminoácidos, formando aminas de reacción alcalina. Las bacterias que tienen la capacidad de producir la enzima lisina descarboxilasa, son capaces de remover la molécula de CO<sub>2</sub> del aminoácido lisina para formar aminas (cadaverina). El medio Moeller, fue la base que se empleó para determinar la capacidad de descarboxilación de las bacterias, éste fue inoculado con una suspensión densa de cultivo de la bacteria sospechosa, y se cubrió con parafina líquida, se incubó a 37°C durante 24 a 96 horas. La presencia de un color púrpura en el medio indicó que la prueba fue positiva, debido a la liberación de aminas en la reacción de descarboxilación, mientras que la presencia de un color amarillo indicó que la prueba fue negativa.

Hidrólisis de la arginina

La conversión de la arginina en citrulina es más una reacción de hidrólisis que de descarboxilación, en el cual, un grupo amino es removido de la arginina para formar citrulina, que luego es convertida en ornitina, la que es descarboxilada para formar putrescina. Este medio se utilizó para demostrar la capacidad de las bacterias de

hidrolizar al aminoácido arginina; se inoculó el medio con un cultivo denso de la cepa de interés. Posteriormente, fueron sellados con parafina líquida para proporcionar las condiciones de anaerobiosis y controlar el pH del medio; se incubaron a 37°C hasta por cuatro (4) días y se realizaron diariamente las lecturas. La presencia de un color púrpura en el medio indicó que la prueba era positiva, debido a la liberación de aminas en la reacción de descarboxilación, mientras que la presencia de un color amarillo indicó que la prueba era negativa.

#### Hidrólisis de la urea

Con esta prueba se pudo determinar la capacidad de las bacterias de hidrolizar la urea por medio de la síntesis de la enzima ureasa, produciendo carbono y amoníaco. Se inoculó un cultivo puro en medio agua peptonada, al cual se le añadió de 4 a 5 gotas de reactivo de urea, se incubó a 37°C por 24 a 96 horas, en aerobiosis. Una prueba positiva se evidenció con la alcalinización del medio y, por lo tanto, el viraje de color del indicador rojo de fenol a un color rosado intenso, mientras que la aparición tardía de un color rosa pálido indicó una reacción negativa.

#### Hidrólisis de la esculina

Esta prueba se utilizó fundamentalmente como característica diferencial entre el género *Brevundimonas* y algunas *Pseudomonas* con pigmento amarillo. Para microorganismos no fermentadores se utilizó un medio con esculina sin bilis, debido a que algunas especies no fermentadoras son inhibidas por la bilis. Se sembró en picos de flauta de agar esculina con la cepa de interés y se incubó a 37°C por 24 a 96 horas. La esculina presente en el medio fluoresce cuando se observa con una lámpara de Wood. Cuando la esculina es hidrolizada, el medio toma un aspecto negro rojizo y se pierde la fluorescencia, lo que indicó un resultado positivo para la prueba.

#### Crecimiento 42°C

Constituyó una prueba diferencial entre las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, donde se verificó la capacidad de estas bacterias de crecer a altas temperaturas. Ésta se realizó por medio de la siembra de las cepas de interés en agar MacConkey, las cuales, se incubaron a 42°C posteriormente durante 24 a 48 horas.

#### Susceptibilidad a la polimixina B

La polimixina es un polipéptido básico de unos ocho aminoácidos, el cual se fija a los fosfolípidos de las membranas de las células bacterianas Gram negativas. Esta unión destruye las membranas bacterianas mediante un efecto detergente, aumentando la permeabilidad de la misma, lo que se traduce en la muerte celular.

Se realizó por el método de difusión en agar (medio Mueller Hinton), descrito por Bauer *et al.* (1966). Se colocó el disco de polimixina (300U); posteriormente, las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C en ambiente de aerobiosis; una vez transcurrido este tiempo, se midió el diámetro del halo generado, para comprobar la efectividad del antibiótico, y así determinar si la bacteria era resistente o no. Se consideraron las cepas como sensibles, cuando ocurría la formación de un halo transparente alrededor del disco  $\geq 11\text{mm}$ .

#### **Determinación de la producción de exopolisacárido a través del método agar rojo congo (MRC) (Bravo *et al.*, 2005)**

Una vez que se identificó la especie de cada aislado, se procedió a preparar una suspensión bacteriana y se sembraron 100  $\mu\text{l}$  por rastrilleo, con una espátula de vidrio, en cada una de las placas de agar nutritivo con 0,02% del indicador rojo congo, el cual indujo una morfología colonial característica de las cepas según producían o no exopolisacáridos, las placas fueron incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Las cepas productoras de exopolisacárido se manifestaron por la presencia de colonias blancas en el agar rojo congo; mientras que las cepas no productoras del exopolisacárido se encontraron representadas por colonias de color rojo.

#### **Determinación de la producción de biopelículas mediante el método de dilución en microplacas (Passerini *et al.*, 2007)**

Se tomaron colonias típicas aisladas de agar MacConkey, se inocularon en caldo nutritivo; seguidamente se realizaron diluciones 1:100 de cada uno de los inóculos estandarizados. Posteriormente se trasvasaron 200  $\mu\text{l}$  de cada dilución a cada uno de los pocillos estériles de la microplaca, se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se estimó el total de biomasa celular, midiendo la densidad óptica  $\text{DO}_{546}$ , utilizando el lector de microplacas ELx800, marca BIO-TEX. Posteriormente las colonias se decantaron y los pozos se lavaron con agua destilada a fin de eliminar las células no adherentes. Luego, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de cristal violeta al 1% a los pozos durante 30 minutos la biopelícula teñida fue enjuagada con agua destilada y se extrajo con 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 95%. La cantidad de biopelícula se cuantificó midiendo la  $\text{DO}_{546}$  del cristal violeta. Cada cepa se analizó por triplicado, se utilizaron controles sin inocular. El corte se definió como tres desviaciones estándar por encima de la media ODC. Cada cepa se clasificó de la siguiente manera.

Productor débil de biopelículas  $\text{OD} \leq 2\text{xODc}$

Productor moderada de biopelículas  $2\text{xODc} < \text{OD} \leq 4\text{xODc}$

Productor fuerte de biopelículas  $\text{OD} > 4\text{xODc}$

Los niveles de tinción con cristal violeta también se expresaron en relación con la densidad celular final (radio de crecimiento) que fue medida antes del ensayo de biopelículas ( $OD_{546} CV / OD_{546}$  radio de crecimiento).

Para la realización de este ensayo, se preparó el control positivo representado por una cepa certificada de *P. aeruginosa* CVCM/787 en la placa de poliestireno estéril. El control negativo utilizado fue el caldo de cultivo estéril para verificar la esterilidad y componentes no específicos de los medios.

### **Determinación de factores de virulencia en aislados de *Pseudomonas* sp.**

Para la realización de cada una de estas pruebas se aplicaron los procedimientos descritos a continuación:

#### Determinación de la actividad ADNasa (Blazevic *et al.*, 1975)

En el medio de cultivo, la tripteína es la fuente de nitrógeno y aminoácidos que aportarán los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra en grado altamente polimerizado, y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (ADNasa), la cual lo hidroliza. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Este medio de cultivo permite diferenciar bacterias que poseen la enzima ADNasa de aquellas que no la poseen.

Se realizó tomando una asada de la cepa en estudio, proveniente de un cultivo de 24 horas en agar MacConkey y se inoculó por el método de estrías por agotamiento en la superficie de agar ADNasa con 0,01% de azul de toluidina, se incubó a 37°C por 18-24 horas. Un halo rosado alrededor de la colonia indicó la actividad de nucleasa, la no evidencia de ningún cambio se leyó como reacción negativa.

#### Determinación de la actividad hemolítica (Robinson, 1986)

El medio adicionado con sangre es útil tanto para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis. La infusión de músculo de corazón y la peptona otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permitirá el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El agregado de sangre al medio de cultivo, en concentración final de 5-10%, aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano. Para determinar la actividad hemolítica, se tomó una asada de la cepa en estudio de un cultivo de 24 horas, proveniente de un cultivo en agar MacConkey y se inoculó en estrías por agotamiento en base de agar sangre con 5% de sangre humana, se incubó 24 horas a 37°C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de la enzima beta hemolisina, la no evidencia de un halo de hemólisis se leyó como negativa.

Determinación de la enzima gelatinasa (Blazevic *et al.*, 1975)

Se utilizó para determinar la licuefacción de la gelatina (producción de gelatinasa) por microorganismos proteolíticos. Contiene extracto de carne y peptona y una elevada concentración de gelatina, el primer agente gelificante utilizado para solidificar medios de cultivo.

Se realizó tomando una asada de la cepa de estudio proveniente de un cultivo de 24 horas en agar MacConkey, y se inoculó por el método de estrías por agotamiento en la superficie del medio agar gelatina, en concentración de 4%, se incubó por 24 horas a 37°C. Una opacidad alrededor de la colonia indicó la producción de la enzima gelatinasa y la prueba se leyó como positiva; cuando no se observó el halo de opacidad, la reacción se tomó como negativa.

#### **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para las cepas identificadas como *Pseudomonas* sp.**

Se realizó mediante el método de difusión en agar, descrito por Bauer *et al.* (1966), siguiendo los lineamientos del Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, 2011), se procedió a tomar de 3-5 colonias aisladas del microorganismo de interés, provenientes del agar MacConkey, que fueron suspendidas en 4,5 ml de Solución Salina Fisiológica Estéril y se incubaron a 37°C, hasta que se observó una turbidez semejante a la del patrón 0,5 de Mac Farland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Posteriormente, se realizó la siembra de la suspensión de bacterias en agar Mueller Hinton, de la casa comercial HIMEDIA, con la ayuda de un hisopo estéril, el cual fue humedecido previamente en esta suspensión, y se diseminó en la superficie del agar en tres direcciones diferentes, luego, se procedió a colocar los discos de antibióticos de elección: amikacina (30 µg), piperaciclina (100 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), tobramicina (10 µg), ceftazidima (30 µg), trimetoprim (1,25 µg), todos de la casa comercial OXOID, esto con la ayuda de una pinza y haciendo un poco de presión. Estas placas fueron incubadas a 37°C, por 24 horas, en aerobiosis, posteriormente, fueron medidos los halos de inhibición y su clasificación en las categorías establecidas por CLSI (2011): en sensible (S), intermedio (I) y resistente (R). Se emplearon como cepas controles, *E. coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. No existen lineamientos para pruebas de susceptibilidad en cepas provenientes del medio ambiente y pertenecientes a la mayoría de los bacilos Gram negativos no fermentadores, sin embargo, en el presente estudio se consideraron los lineamientos establecidos por CLSI (2011) para muestras clínicas. Los patrones de susceptibilidad antimicrobiana fueron expresados en porcentajes de resistencia y sensibilidad. Los halos de inhibición de las pruebas de susceptibilidad se expresaron en milímetros (mm).

### **Análisis estadístico**

Para analizar los resultados, se realizó estadística descriptiva a través de tablas y figuras, con la finalidad de establecer comparaciones, diferencias y relaciones entre la producción de biopelículas, la resistencia antimicrobiana y los factores de virulencia de los niveles de las variables estudiadas (Milton, 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Pseudomonas* sp. tiene la capacidad de colonización, adherencia y de producir biopelículas, lo cual representa una estrategia de supervivencia, que le confiere protección contra los mecanismos de erradicación bacteriana (Moore *et al.*, 2002). Las bacterias logran ventajas significativas proporcionadas por la producción de biopelículas, frente a fluctuaciones medio ambientales de humedad, temperatura y pH, al igual que concentrando nutrientes y facilitando la eliminación de desechos (Post *et al.*, 2004).

De un total de 70 cepas aisladas a partir de muestras de aguas y sedimentos provenientes de las diferentes pozas ubicadas en el balneario turístico Aguas de Moisés, se identificaron 36 microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, 8 cocos Gram positivos y 26 BGNNF, de los cuales 21 cepas correspondieron a *Pseudomonas* sp.

En la tabla 1 se muestra la diversidad de especies de *Pseudomonas* sp. con un total de 21 cepas (100%), donde 7 (33,33%) cepas pertenecen a la especie *Pseudomonas aeruginosa*, seguido de *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* con un total de 5 (23,81%) cepas cada una, y con un menor número de aislamiento *Pseudomonas mendocina* 4 (19,05%) cepas.

Tabla 1. Diversidad de especies *Pseudomonas* sp. provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010.

Microorganismos	Nº	%
<i>P. aeruginosa</i>	7	33,33
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	5	23,81
<i>P. stutzeri</i>	5	23,81
<i>P. mendocina</i>	4	19,05
Total	21	100

Nº= número de cepas aisladas, %= porcentaje.

Estos resultados muestran la diversidad de especies de *Pseudomonas* sp. aisladas de muestras de aguas y sedimentos analizadas, y en donde se puede apreciar que, la especie que más predomina es *P. aeruginosa*, con un total de 7 (33,33%) cepas. Los resultados obtenidos en este estudio son muy similares a los reportados por Lösch *et al.* (2004), en el cual pudieron aislar 47 cepas de este género bacteriano, provenientes de aguas subterráneas y superficiales de la provincia del Chaco (Argentina). Estudios similares se han desarrollado en el estado Sucre, a partir de muestras ambientales, tomadas de aguas y sedimentos de la cuenca del río Manzanares, donde se identificaron 18 cepas, de las cuales 16 (88,89%) de ellas correspondían a *P. aeruginosa* y las 2 (11,11%) cepas restantes a *Pseudomonas* sp. González (2010). Por otro lado, Rivas (2011) demostró que los microorganismos con más frecuencia de aislamientos de muestras de sedimentos provenientes de las diferentes pozas de las aguas termales, ubicadas en el balneario turístico Aguas de Moisés, fueron los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, representando el 51,42% de todos los aislamientos; mientras que los BGNNF se aislaron

en un 37,13% y los cocos Gram positivos en el 11,42%, obteniendo que las cepas con mayor aislamiento correspondieron a *Pseudomonas* sp. dentro del grupo de BBNNF.

*P. aeruginosa* es una bacteria dispersa en el ambiente, habitualmente presente en suelos, aguas y superficies, con emergente relevancia como patógeno oportunista causante de infecciones en pacientes hospitalizados inmunodeprimidos. Constituye el grupo de microorganismo más frecuentemente aislado, capaces de vivir bajo diversas condiciones ambientales (Hoiby, 2002).

El género *Pseudomonas* es capaz de utilizar una amplia variedad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, así como también sustratos para crecer; ésta capacidad le permite a estos microorganismos, colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes; así mismo, son capaces de vivir bajo diversas condiciones ambientales, mostrando una alta capacidad a reacciones físico-químicas y biológicas (Arraíz, 2001).

Los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* pudieran colonizar ambientes acuáticos con pocos nutrientes y encontrarse en aguas subterráneas no contaminadas por el hombre, como es el caso de *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri* y *P. mendocina*, que raramente forman parte de la flora humana normal. En este estudio las bacterias aisladas pueden ser consideradas como población autóctona de manantiales mesotermas. Las aguas en estudio presentaron un pH que osciló entre 6,5 y 8,0 y una temperatura entre 33 y 35°C, dicha temperatura y pH demuestran diferentes tipos de comunidades microbianas en manantiales termales. Los manantiales con pH alcalino tienen poca diversidad microbiana, encontrándose a *Pseudomonas* sp. capaces de vivir a estos pH y en estas aguas.

La tabla 2 muestra la producción de exopolisacárido en *Pseudomonas* sp. a través del método agar rojo congo, donde de las 21 cepas estudiadas, 19 (90,48%) resultaron ser productoras del mismo, observándose colonias de color blanco; mientras que, 2 (9,52%) de las cepas resultaron ser no productoras, representado por colonias de color rojo. La presencia del exopolisacárido se observó en 7 (100%) de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas; en 5 (100%) cepas de *P. pseudoalcaligenes* y 4 (100%) cepas de *P. mendocina*; cabe resaltar que 3 (60,00%) de las cepas de *P. stutzeri* resultaron productoras y 2 (40,00%) no lo fueron.

Tabla 2. Comportamiento de *Pseudomonas* sp. en la producción de exopolisacárido, a través del método agar rojo congo, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010.

Microorganismos	PE	%	NPE	%
<i>P. aeruginosa</i>	7	100	-	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	5	100	-	-
<i>P. stutzeri</i>	3	60,00	2	40,00
<i>P. mendocina</i>	4	100	-	-

PE= productoras de exopolisacárido, %= porcentaje, NPE= no productoras de exopolisacárido.

La gran mayoría de las especies de *Pseudomonas* sp. aisladas, independientemente de su origen, es decir, de aguas y sedimentos, fueron capaces de formar exopolisacárido, a través del método rojo congo (figura 1), no ocurre la absorción del colorante, por lo que no se tiñe de color rojo, observándose colonias de color blanco. En un estudio realizado por Callicó *et al.* (2004) se pudo demostrar que, de 18 cepas evaluadas de *P. aeruginosa*, el 72,20% de ellas, fueron productoras de exopolisacárido; resultados que difieren a los obtenidos en el presente estudio, donde todas las cepas de *P. aeruginosa*, fueron formadoras del mismo. Es importante mencionar que en el estudio realizado por estos investigadores, las cepas aisladas eran de origen clínico, lo que orienta que, tanto cepas de *Pseudomonas* sp. ambientales como hospitalarias son capaces de formar exopolisacárido, en cualquier tipo de hábitat. Se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias, independiente de la especie, pueden existir dentro de las biopelículas adheridas a superficies en una interfase sólido/líquida (Chole y Faddis, 2003).

Por otra parte, es importante destacar, la presencia de otro tipo de morfología presente en 2 (9,52%) de las cepas aisladas, no formadoras de exopolisacárido; representadas por colonias de color rojo. Al respecto, Chung *et al.* (2003) señala que la presencia de estas colonias rojas, se deba a la absorción del colorante y que la misma es debido a la pérdida o modificación de un ligando o a la secreción de un factor que impide la unión del rojo congo.

La formación de biopelículas contribuye a la patogenicidad de determinados microorganismos, y la persistencia de ellas en el cuerpo humano sería la principal causa de la recurrencia o cronificación de diversas infecciones, de igual forma, es importante destacar que las cepas productoras de exopolisacárido le confiere a la bacteria la capacidad de escapar de la acción de los macrófagos (Reisner *et al.*, 2006).

Las especies de *Pseudomonas* son productoras de grandes cantidades de alginato, por lo tanto, no son capaces de absorber el colorante. Esta prueba constituye un marcador indirecto de la virulencia de estos microorganismos; en tal sentido, las cepas de mayor virulencia son precisamente las que no son capaces de absorber el colorante rojo congo, esto ocurre debido a la capa del exopolisacárido que la recubre, la cual imposibilita este efecto y, además, dicho compuesto confiere a la cepa, un alto grado de virulencia, debido a que le permite crecer tanto en tejidos vivos como inertes (Costerton y Stewart, 2000).

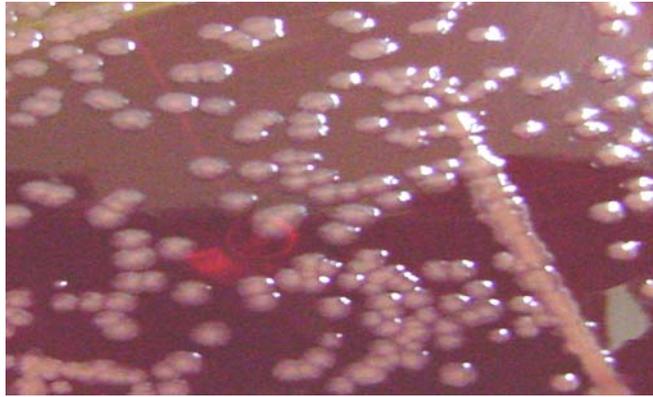


Figura 1. Producción de exopolisacárido determinado a través del método rojo congo en cepas de *Pseudomonas* sp. provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010. colonias productoras de exopolisacárido (*P. aeruginosa* P1E34).

Dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentren las cepas, se pueden producir distintos tipos de exopolisacáridos, como componentes de la matriz de la biopelícula (Lasa, 2006). Algunas cepas de *Pseudomonas* sp. son capaces de producir además de alginato, otro tipo de polisacárido ricos en glucosa que son codificados por un grupo de genes denominados *pel* (nombre que deriva de *pellican*, biopelícula formada por *Pseudomonas* sp. en la interfase agua-aire) y serían los principales componentes de la matriz, responsables además de inducir la rugosidad en las colonias; de igual manera, la presencia de monosacáridos en la matriz, son codificados por los genes *psl* (*polysaccharide synthesis locus*), que pudieran estar igualmente vinculados con la observación de nuevos fenotipos de *Pseudomonas* sp. dichas variaciones, pueden ser el resultado de la adaptación de los microorganismos a condiciones adversas del medio ambiente para poder sobrevivir (Friedman y Kolter, 2004).

*Pseudomonas* es un género capaz de producir colonias lisas, aunque algunas mutantes de colonias rugosas, han podido ser descritas en la formación de exopolisacárido. D'Argenio *et al.* (2002) señala que, esta pérdida de morfología, posiblemente se encuentre relacionada con cambios de la producción extracelular de la matriz, de igual manera, pueden influir algunos factores propios del ambiente donde se desarrollan estos microorganismos (pH, temperatura, oxígeno, nutrientes, entre otros), o al estrés que presentan ante un medio inadecuado para su crecimiento.

Otro factor que influye negativamente en la formación del exopolisacárido es la ausencia en bacterias de factores de adherencia como glicocáliz, fimbrias, que no pudieran estar presentes en el caso de *P. stutzeri* y que haría difícil la formación del mismo, éste género bacteriano presenta pilis tipo IV que le confiere movilidad de forma crisar (un movimiento basado en la extensión bacteriana pilus/retracción), esto dificulta la adherencia bacteriana a superficies (Lasa, 2006).

A través del método de dilución en microplacas, utilizado en el presente trabajo de investigación, se demostró que las 21 cepas en estudio (100%) fueron capaces de formar anillos similares en las paredes de los pozos de la microplaca utilizada, demostrando la producción de biopelículas débiles, por parte del género bacteriano en estudio (figura 2).

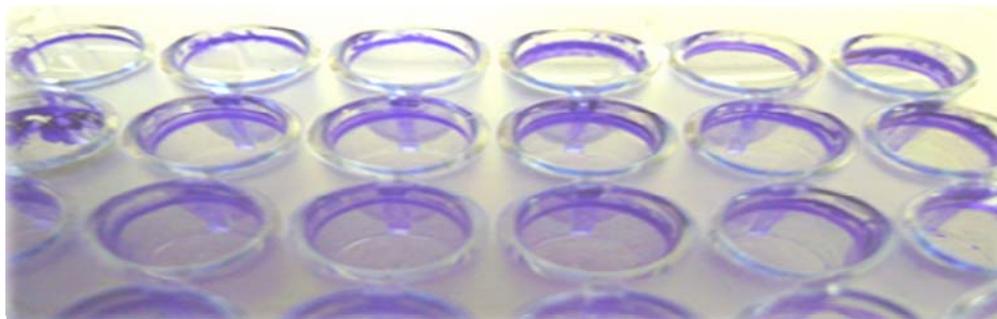


Figura 2. Producción de biopelículas en cepas de *Pseudomonas* sp. provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010, mediante el método de dilución en microplacas. Este método es muy laborioso, requiere preparaciones previas de las cepas; no obstante, mediante esta técnica se puede evaluar la capacidad de los aislados bacterianos de formar biopelículas, así como también, cuantificar la cantidad de la misma que una bacteria es capaz de producir.

Los resultados obtenidos en este estudio, son muy similares a los reportados por Ponce (2010), en el cual pudo aislar 36 cepas de *P. aeruginosa*, provenientes de muestras de centros hospitalarios y, de las cuales, 25 fueron capaces de producir biopelículas, con un bajo porcentaje de obtención de resultados falsos positivos, empleando el método antes señalado.

Por otra parte, González (2010) pudo demostrar que de las 16 cepas aisladas de *P. aeruginosa*, 14 (87,50%) fueron capaces de formar biopelículas y sólo 2 (12,50%) de las cepas no presentaron dicha propiedad, utilizando el método clásico de la safranina en tubo; estas cepas aisladas eran provenientes de muestras de sedimentos de las márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre. A pesar de que este método no fue el mismo empleado en el presente trabajo de investigación, es importante resaltar que, dicho método también es capaz de evaluar la producción de biopelículas, siendo éste un factor clave en la adaptación y supervivencia de los microorganismos a un determinado ambiente. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, donde se obtuvieron altos porcentajes de cepas productoras de biopelículas.

A pesar de que, no todas las cepas fueron productoras de exopolisacárido, las mismas si fueron capaces de formar biopelículas; esto puede deberse a que independientemente de la expresión del exopolisacárido, algunas cepas de *Pseudomonas* sp. son capaces de producir además de alginato, otros componentes en la matriz como monosacáridos:

mannosa, galactosa y trazas de xilosa, los cuales podrían ser necesarios para la formación de la biopelícula (Friedman y Kolter, 2004).

Es importante resaltar que, con la técnica de dilución en microplacas se puede determinar cualitativa y cuantitativamente la producción de biopelículas, observándose claramente mediante la formación de un anillo, el cual puede ser cuantificado por espectrofotómetro, para confirmar de esta manera si las cepas en estudio producen o no biopelículas.

Los microorganismos comúnmente se adhieren a superficies, tanto vivas como inertes, valiéndose de estructuras celulares superficiales como: fimbrias, lipopolisacárido extracelular (LPS), polímeros extracelulares (EPS), flagelos y otras proteínas (Post *et al.*, 2004).

Las especies de *Pseudomonas* corresponden a patógenos Gram negativos, versátiles y oportunistas; debido a su gran adaptabilidad al medio ambiente, potencial metabólico y mecanismos de virulencia, es causa frecuente de infecciones y algunos de ellos son capaces de producir componentes, especialmente toxinas, que los hacen especialmente virulentos comparados con otros microorganismos, de igual forma, la expresión de factores de virulencia específicos confiere una creciente capacidad de adaptación a nuevos nichos, permitiendo un largo espectro de enfermedades. La diversidad de mecanismos patogénicos de esta bacteria en individuos, aparentemente sanos, es atribuida a una gran variedad de factores de virulencia específicos, que contribuyen a un aumento de eficacia en la colonización de superficies específicas del hospedador, evasión de las defensas inmunológicas o daño directo a sus células o tejidos, lo que resulta en el establecimiento de la enfermedad (Branda *et al.*, 2005). La amplia variedad de factores de virulencia que caracterizan a *Pseudomonas* sp. inciden directamente sobre su elevada tasa de mortalidad.

La infección por este género bacteriano raramente ocurre en personas con defensas normales; para que la infección se presente deben existir factores predisponentes, como: enfermedades malignas, hematológicas, metabólicas, así como también, deben existir brechas en las defensas físicas del cuerpo, como las producidas por heridas, quemaduras o úlceras, lo cual permite que especies como *P. aeruginosa* logren colonizar la superficie de un hospedero susceptible (Wilson y Dowling, 2008).

En la tabla 3 se puede observar la presencia de los factores de virulencia en cepas de diferentes especies del género *Pseudomonas*. La producción de hemolisina estuvo presente en 11 (52,38%) de las cepas aisladas, seguido de la enzima gelatinasa, presente en 9 cepas (42,86%).

En América Latina son escasos los estudios sobre factores de virulencia realizados en microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Tabla 3. Presencia de factores de virulencia: actividad ADNasa, actividad hemolítica, enzima gelatinasa, en aislados de *Pseudomonas* sp. productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010.

Microorganismos	ENZIMAS			
	Nº	ADNasa	Hemolisina	Gelatinasa
<i>P. aeruginosa</i>	6	(-)	(-)	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	1	(-)	(+)	(-)
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	3	(-)	(-)	(-)
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	2	(-)	(+)	(-)
<i>P. mendocina</i>	1	(-)	(-)	(-)
<i>P. mendocina</i>	3	(-)	(+)	(-)
<i>P. stutzeri</i>	3	(-)	(+)	(+)
<i>P. stutzeri</i>	2	(-)	(+)	(-)
Total	21			

Nº= número de cepas aisladas con el factor de virulencia en estudio.

Se puede observar que, de las 7 cepas aisladas de *P. aeruginosa*, 6 de ellas presentaron solo la enzima gelatinasa y 1 presentó solo la actividad hemolítica. En relación a la especie *P. pseudoalcaligenes*, de las 5 cepas, 2 de ellas fueron capaces de producir hemolisina. Para *P. mendocina*, de las 4 cepas aisladas, sólo 3 de ellas produjeron la hemolisina y, por último, se encuentra la especie *P. stutzeri*, que de las 5 cepas aisladas, sólo 3 de ellas presentaron actividad hemolítica y la enzima gelatinasa, mientras que las 2 cepas restantes, sólo presentan la actividad hemolítica. Es importante resaltar que la enzima DNasa, no estuvo presente en ninguna de las cepas en estudio, resultando ser todas negativas para dicha prueba.

En este estudio, los resultados reflejan algunas diferencias en algunos casos con respecto a la producción de las enzimas ADNasa, hemolisinas y gelatinasa; dicha diferencia se encuentra demarcada por variaciones de uno o dos factores de virulencia, a excepción de 3 cepas de *P. pseudoalcaligenes* y 1 cepa de *P. mendocina*, las cuales fueron negativas para todos los factores de virulencia estudiados.

Es importante mencionar que las cepas estudiadas no fueron capaces de excretar nucleasas, por lo que no ocurrió la despolimerización del DNA; estos resultados se ajustan a los patrones de identificación para BGNNF, descritos por Koneman *et al.* (2008).

Las hemolisinas constituyen una de las características claves del género *Pseudomonas*, así mismo son consideradas un importante factor de virulencia, pues constituyen exotoxinas proteicas termolábiles, que presentan una acción lítica sobre los hematíes y una acción tóxica sobre otras células (leucocitos, macrófagos, fibroblastos). *P. aeruginosa* tiene muchos factores de virulencia, entre éstos se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas importantes; sin embargo, es difícil definir el papel que

cada factor desempeña en la enfermedad, y la mayoría de los expertos en este campo creen que su virulencia es multifactorial (Shaver y Hauser, 2004).

Algunas especies de *Pseudomonas* son capaces de producir enzimas proteolíticas (gelatinasas) que hacen posible la licuefacción de la gelatina, permitiendo así hidrolizar estos complejos polímeros y convertirlos en monómeros. Estas enzimas extracelulares, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas, permitiendo de esta manera la entrada a la célula bacteriana de componentes más pequeños, que ayudan al patógeno a crecer (Gandón, 2002).

Los microorganismos que no presentaron factores de virulencia pudieran ser empleadas en procesos de biocontrol y biorremediación, así como también, pudieran ser idóneas para combatir o eliminar la proliferación de bacterias que pudieran causar daños o riesgos a la salud del ser humano.

Con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa* (Tabla. 4), se observó que las mismas mostraron sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos ensayados, a excepción del meropenem, ante el cual, 3 de las 7 cepas fueron resistentes.

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010.

Antimicrobiano	N° Sensibles	%	N° Resistentes	%
Gentamicina	7	100	-	-
Ciprofloxacina	7	100	-	-
Tobramicina	7	100	-	-
Celtazidime	7	100	-	-
Trimethoprim	7	100	-	-
Amikacin	7	100	-	-
Meropenem	4	57,14	3	42,86
Piperaciclina	7	100	-	-
Imipenem	7	100	-	-

%= porcentaje.

N°= número de cepas sensibles o resistentes al antimicrobiano ensayado.

Es importante destacar que en el manual del CLSI, los lineamientos establecidos para la susceptibilidad son únicamente para bacterias provenientes de muestras clínicas y no para bacterias provenientes de origen ambiental, como las que fueron aquí estudiadas; sin embargo, las mismas fueron utilizadas como referencia en el caso de *P. aeruginosa*. La susceptibilidad antimicrobiana observada en el presente estudio, puede deberse a que las cepas ambientales no se encuentran sometidas a la fuerte presión selectiva que existe en el entorno hospitalario; así mismo, no se encuentran expuestas a la continua acción selectiva de los desinfectantes, de manera que, a diferencia de los aislados ambientales,

el desarrollo de mecanismos de resistencia en cepas clínicas es más elevado, permitiendo a la bacteria evadir la acción de diferentes antimicrobianos (Martínez, 2007).

Los reportes de resistencia en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de ambientes naturales son escasos y la mayoría han estado dirigidas a aislamientos clínicos; debido a la insuficiente referencia sobre la susceptibilidad antimicrobiana de éstas cepas, es por ello, que se utilizan antecedentes de aislados clínicos.

Al respecto, Lösch *et al.* (2004), pudieron determinar la susceptibilidad antimicrobiana en 47 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de aguas subterráneas y superficiales, con resultados similares al presente estudio, donde se pudo observar un alto grado de sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos empleados, a excepción de las tres cepas de *P. aeruginosa* que resultaron ser resistente al meropenem. La resistencia antimicrobiana por parte de las cepas se puede producir a través de mutaciones de genes al azar o a la transferencia y adquisición de éstos (plásmidos, trasposones e integrones), lo que conlleva a una resistencia adquirida (Vila y Marco, 2010).

La presencia de bombas de expulsión activa se ha descrito como un mecanismo de resistencia frecuente en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma bacteriano algunos compuestos tóxicos para la bacteria. Otra explicación sería una activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria (Vila y Marco, 2010).

En la tabla 5 se muestra la relación entre dos factores de virulencia determinados en este estudio, como lo fueron la actividad hemolítica y la acción de la gelatinasa en *Pseudomonas sp.*, donde se refleja la presencia y ausencia de dichos factores de virulencia en cada una de las cepas estudiadas.

*P. aeruginosa* se comporta como una bacteria oportunista capaz de tener diversas aplicaciones biotecnológicas sobre todo en el área ambiental. En el presente estudio se demostró que las cepas de *P. aeruginosa* presentaron, por lo menos, uno de los factores de virulencia estudiados, a diferencia de otras especies de *Pseudomonas*, las cuales no presentaron ninguno de los factores de virulencia.

Tabla 5. Tabla de contingencia en la asociación entre dos factores de virulencia: actividad hemolítica y producción de gelatinasa en aislados de *Pseudomonas sp.*, productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, municipio Ribero, estado Sucre, octubre de 2009 - enero de 2010.

		Actividad Hemolítica y Gelatinasa		
		Gelatinasa		Total
		Negativo	Positivo	
Actividad Hemolítica	Negativo	4	6	10
	Positivo	8	3	11
Total		12	9	21

P>0,05

De esta tabla se desprende que el resultado para el estadístico de Chi-cuadrado de Pearson fue de 2,291, con un nivel de significancia de 0,130. Este valor resultó ser superior a 0,05, por lo que se acepta la hipótesis nula (H<sub>0</sub>), y se puede concluir que no existen relaciones entre la actividad hemolítica y la producción de gelatinasa; es decir, la presencia de hemolisinas puede presentarse o no en cepas de *Pseudomonas* sp., indistintamente de que las cepas en estudio produzcan o no la enzima gelatinasa; de igual forma, es importante destacar que el factor que más predomina es la actividad hemolítica.

Al relacionar los factores de virulencia con la producción de biopelículas en los aislados de *Pseudomonas* sp. se observó que la formación de biopelículas se presenta en todas las cepas evaluadas, indistintamente que presenten o no los factores de virulencia estudiados, lo que indica que no existe una asociación entre estas dos variables. Sin embargo, es importante destacar que la biopelícula es considerada como un factor de virulencia para este género bacteriano, contribuyendo de esta manera a la patogenicidad de dicha bacteria. Es probable que *P. aeruginosa* sea ineficiente en su habilidad para llevar a cabo los primeros pasos de la infección en un individuo sano; puede colonizar pero no invadir piel y mucosas sanas, y tampoco producir infecciones persistentes con producción de factores tóxicos que dañen los tejidos del hospedero (Wilson y Dowling, 2008).

Se pudo comprobar que las cepas provenientes de ambientes naturales, sensibles o no al antimicrobiano empleado, son capaces de formar biopelículas; estos resultados pueden orientar a que estas cepas utilizan las biocapas como un mecanismo de protección contra algunos factores externos presentes en el medio ambiente donde se desarrollan los microorganismos; de igual manera, estas biopelículas pueden prevenir el acceso de determinados agentes antimicrobianos o restringir la difusión de los antibióticos al interior de éstos (Danese *et al.*, 2000).

Así mismo, es posible que la formación de las biopelículas se deba a la existencia de comunidades microbianas fuertemente adheridas a superficies inertes o vivas, en la que los microorganismos que la conforman están, a su vez, interactuando entre sí. Es importante destacar que el proceso de formación de biopelículas se encuentra también regulado por un sistema de señales químicas, ayudando a la adaptación y a la virulencia de *P. aeruginosa* en el ambiente donde se encuentre, jugando un papel esencial en el mantenimiento y mejora de la calidad medio ambiental (Takumida y Anniko, 2006).

## CONCLUSIONES

19 de las 21 cepas de *Pseudomonas* sp. estudiadas tienen la capacidad de producir exopolisacárido, mediante la prueba del rojo congo,

Todas las cepas de *Pseudomonas* sp. fueron productoras de biopelículas débiles por el método de dilución en microplacas.

17 de las 21 cepas aisladas presentaron, por lo menos, uno de los tres factores de virulencia estudiados, siendo la hemolisina, la enzima que más predominó en las cepas aisladas, seguido de la enzima gelatinasa.

A excepción de 42,86% de cepas que resultaron resistentes a meropenem, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados.

La producción de biopelículas en *Pseudomonas* sp. es independiente de la resistencia antimicrobiana, producción de ADNasa, gelatinasa y/o hemolisina.

## RECOMENDACIONES

Es conveniente realizar estudios que incluyan una mayor cantidad de cepas, con la finalidad de estudiar los diferentes fenotipos de las colonias aisladas, para de esta manera obtener resultados más certeros.

*Pseudomonas* sp. pudieran tener diversas aplicaciones biotecnológicas útiles en el tratamiento de la contaminación ambiental, contribuyendo de esta manera al reciclaje biológico de materia orgánica, por ello es necesario, realizar estudios que permitan evaluar la capacidad de este género bacteriano en el mantenimiento y mejora de la calidad del medio ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arráiz, N. 2001. *Quorum Sensig* y virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*. Kasm. Maracaibo. 29(1): 97-118.
- Balows, A.; Housier, W.; Hermann, K.; Isenberg, H. y Shadomy, M. 2007. *Manual of clinical microbiology*. Eighth edition. Washington, American society for microbiology.
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por método estandarizado. *American journal of clinical pathology*, 45: 493-496.
- Blazevic, D.; Ederer, G. y Wiley, J. 1975. Principles of biochemical test in diagnostic microbiology. New York.
- Branda, S.; Vik, S.; Friedman, L. y Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends microbial*, 13: 20-26.
- Bravo, L.; Salazar, D.; Arce, M.; García, H.; Ramírez, M.; Cabrera, E.; Fernández, A. y Castañeda, N. 2005. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shiguelloides* aisladas en animales domésticos y afectivos. *Revista electrónica veterinaria REVET*, 6(11): 29-33.
- Callicó, A.; Cedré, B.; Sifontes, S.; Torres, V.; Pino, Y.; Callís, A. y Esnard, S. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista cubana Vaccimonitor*, 13(3): 107-112.
- Chole, R. y Faddis, B. 2003. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: A possible mechanism to explain chronicity. *Archivo of Otolaryngology. Head. Neck Surgery*, 129: 634-636.
- Chung, J.; Altman, E. y Beveridge, T. 2003. And Speert D. Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: implication in exopolisaccharide production, pilus expression, persistence in the mouse. *Infection and immunity*, 71(2): 904-909.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-first informational supplement. *Document M100-S21*. Wayne, Pennsylvania, 31(1): 42-46.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 2002. *Aguas naturales, industriales*. Definiciones. Norma 2634. Fondo para la normalización. Caracas, Venezuela.

- Costerton, J. y Stewart, P. 2000. Biofilms and device-related infections. *Persistent Bacterial Infections*. Washington, American society for microbiology.
- Danese, P.; Pratt, L. y Kolter, R. 2000. Exopoly saccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal Bacteriol*, 182(12): 3593-3596.
- D'Argenio, D.; Calfee, M.; Rainey, P. y Pesci, E. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *Journal Bacteriologia*, 184: 6481-6489.
- Donlan, R. 2002. Biofilms. Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9): 881-890.
- Fernández, R. 2008. Moisés sus aguas garantizan diversión y relax. <[http://enorientecolombia.com/index.php?option=com\\_content&view=article&catid=64:sucres&id=51moyses-sus-aguas-garantizan-diversi-relax](http://enorientecolombia.com/index.php?option=com_content&view=article&catid=64:sucres&id=51moyses-sus-aguas-garantizan-diversi-relax)>(20/12/2009).
- Fredrickson, J. y Zachara, J. 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. *Applied environmental microbiology*, 70(7): 41.
- Friedman, L. y Kolter, R. 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(7): 4457-4465.
- Gandón, F. 2002. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature*, 414: 751-756.
- González, M. 2010. Aislados de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelículas en la cuenca del Río Manzanares, Cumaná, estado Sucre. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Hagedorn, C.; Gould, T., Bardinell, Y. y Gustavson, D. 1987. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Applied environmental microbiology*, 53: 2265-2268.
- Hoiby, N. 2002. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 235-238.
- Hucker, G y Conn, H. 1923. Methods for gram staining. *Technique bulletin*, 93(5): 1-37.
- Iglewski B. y Smith, R. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential

antimicrobial target. *Journal Clinical Invest*, 112: 1460-5.

Jorgensen, S. y Halling, B. 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40: 691-699.  
Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Winn, W. 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lasa, I. 2006. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology*, 9: 21-28.

Lipsitch, M. y Samoret, M. 2002. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: population perspective. *Emerging infectious diseases*, 8(4): 347-354.

Lösch, S.; Merino, A. y Alonso, J. 2004. Resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco (Argentina). Instituto de Medicina Regional, 2: 43-50.

MacFaddin, J. 2002. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Madigan, M. y Martinko, J. 2005. *Brock biología de los microorganismos*. Onceava edición. Prentice Hall.

Maier, M. y Soberón, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 54: 625-633.

Marsh, P. 2005. Dental plaque. Biological significance of a biofilms and community life- style. *Journal clinical periodontology*, 32(6): 745.

Martínez, L. 2007. *Pseudomona aeruginosa*. Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a los antimicrobianos. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.

Milton, J. 2001. *Estadística para biología y ciencias de la salud*. Tercera edición. Editorial McGraw-Hill/Interamericana de España S.A.U. Madrid.

Moore, E.; Heaney, N.; Millar, C., Crowe, M. y Elborn, J. 2002. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Communit diseases*, 5(1): 23-26.

Mulusky, D. 1974. *Ecology of estuaries*. Heineman educational books. London.

Passerini, B.; Calenda, M.; Vay, C. y Franco, M. 2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from decive-associated nosocomial infections. *Revista argentina de microbiología*, 39: 204-212.

Ponce, Y. 2010. Evaluación de métodos cualitativos y cuantitativos para la detección de biopelícula en aislados de *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas* sp. de muestras provenientes de centros hospitalarios, Trabajo de grado. Postgrado en biología aplicada.

Post, J.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. y Ehrlich, G. 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 12: 185-190.

Prescott, L.; Harley, J y Klein, D. 2002. *Microbiología*. Quinta edición. Editorial McGraw-Hill, Interamericana, Madrid. España.

Reisner, A.; Krogfelt, K.; Klein, B.; Zechner, E. y Molin, S. 2006. In vivo biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *Journal Bacteriol.*, 188: 3572-3581.

Rivas, P. 2011. Detección de biopelículas y agregaciones bacterianas en bacilos Gram negativos no fermentadores, presentes en sedimentos y aguas termales. Cariaco. Municipio Ribero, estado Sucre. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Robinson, J. 1986. Comparison of direct plating with the use of enrichment culture of isolating of *Aeromonas spp* form faeces. *Journal of medical microbiology*, 22: 315-317.

Romero, J. y Salas, T. 1993. Estudio de frecuencias de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados aisladas de ambientes marinos. *Biotechnology and bioengineering*, AM54-57.

Salazar, D. y González, A. 2002. Susceptibilidad antimicrobiana y serotipaje de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH/SIDA. *Revista cubana de medicina tropical*, 54: 142-146.

Shaver, M. y Hauser R. 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection immunity*, 72(12): 6969-6977.

Takumida, M. y Anniko, M. 2006. Protective effect of edaravone against the ototoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Acta otolaryngol.*, 126(1): 15-19.

Urbani, F. 1991. Fuentes de aguas termales de Venezuela. *Geotermia*, 2: 2-3.

Vila, J. y Marco, F. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos Gram Negativos no fermentadores. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 28(10): 726-736.

Wilson, R. y Dowling, R. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax.*, 53: 213-219.

Wu, H.; Song, Z. y Hentzer, M. 2004. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 53: 1054-1061.

## **HOJAS DE METADATOS**

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

<b>Título</b>	FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE <i>Pseudomonas</i> sp. PRODUCTORAS DE BIOPELÍCULAS, PROVENIENTES DE AGUAS Y SEDIMENTOS DEL BALNEARIO TURÍSTICO AGUAS DE MOISÉS
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Alfonzo González, Edith Josefina</b>	<b>CVLAC</b>	<b>17417186</b>
	<b>e-mail</b>	<b>edithalfonzogonzalez@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	

**Palabras o frases claves:**

<b>Biopelículas.</b>
<b>Factores de virulencia.</b>
<i>Pseudomonas</i> sp.

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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

Con el propósito de detectar la presencia de factores de virulencia en aislados de *Pseudomonas* sp. productoras de biopelículas, provenientes de aguas y sedimentos del balneario turístico Aguas de Moisés, se llevó a cabo el presente trabajo, en el período comprendido entre octubre del año 2009 - enero del 2010. La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas convencionales, empleadas para bacilos Gram negativos no fermentadores. La producción de exopolisacárido (alginato), se realizó a través del método rojo congo y la producción de biopelículas, por el método de dilución en microplacas; la detección de enzimas extracelulares (ADNasa, hemolisina y gelatinasa) se determinaron por el método de estrías por agotamiento en la superficie de cada uno de los medios específicos: agar ADNasa, agar sangre y agar gelatina, respectivamente. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión en agar, siguiendo los lineamientos establecidos por el CLSI (2011). En 19 (90,48%) de las 21 cepas aisladas, se detectó la presencia de exopolisacárido, mientras que, 2 (9,52%) cepas de *Pseudomonas stutzeri*, resultaron ser rojo congo negativo (no presentaron exopolisacárido). Por el método de dilución en microplacas, todas las cepas de *Pseudomonas* sp. fueron productoras débiles de biopelículas. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, fueron las especies que presentaron mayor positividad a los factores de virulencia estudiados, seguido de *Pseudomonas stutzeri*. De las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudiadas, 7 (57,14%) presentaron sensibilidad a los antimicrobianos utilizados, mientras que 3 (42,86%) de ellas, mostraron resistencia al meropenem. De acuerdo a estos resultados, todas las cepas, tanto sensibles como resistentes al antibiótico empleado, son productoras de biopelículas, lo que permite su colonización en diversos ambientes. Se han descrito numerosos factores de virulencia asociados a las especies del género *Pseudomonas*, siendo la enzima hemolisina el factor que mas prevalece en las cepas estudiadas.

## 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"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.000.717
	e-mail	Yamasi40@gmail.com
	e-mail	
Antón Dina	ROL	C <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8647499
	e-mail	dinacar@hotmail.com
	e-mail	
Salazar Elsa	ROL	C <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	10460717
	e-mail	Elsazul2003@yahoo.es
	e-mail	
Ponce Yusulbeht	ROL	C <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11829822
	e-mail	yusulbeht@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-AlfonzoE.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 – 5/6



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.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR <i>Martínez</i>
FECHA <i>5/8/09</i> HORA <i>5:30</i>

Cordialmente,

*Juan A. Bolanos*  
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 / Telfa: 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”.



---

**Edith Alfonzo**  
**Autor**



---

**Dra. Yasmina Araque**  
**Asesora**



---

**MSc. Dina Antón**  
**Coasesora**