



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

ANTAGONISMO DE SUSTANCIAS EXTRACELULARES DE AISLADOS DE
Pseudomonas sp. PROVENIENTES DE LA CUENCA DEL RÍO MANZANARES
CUMANÁ, ESTADO SUCRE.
(Modalidad: Investigación)

Jenire Jesús Barrios Chópite

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

Cumaná, 2010

ANTAGONISMO DE SUSTANCIAS EXTRACELULARES DE AISLADOS DE
Pseudomonas sp. PROVENIENTES DE LA CUENCA DEL RÍO MANZANARES
CUMANÁ, ESTADO SUCRE.

APROBADO POR:

Dra. Yasmina Araque Calderón
Asesora Académica

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	9
Descripción del área geográfica:.....	9
Estaciones de muestreo:.....	9
Recolección de las muestras de agua:.....	10
Dilución de las muestras de agua:.....	10
Caracterización morfológica de las colonias:	11
Identificación microscópica:.....	11
Subcultivo en medio Mac Conkey y agar LB:.....	11
Caracterización Bioquímica de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF):... 12	
Prueba de la oxidasa:	12
Agar hierro triple azúcar:.....	12
Agar motilidad:.....	13
Prueba de utilización de carbohidratos O/F para no fermentadores (glucosa, maltosa, manitol y sacarosa):.....	13
Descarboxilación de aminoácidos (lisina):	13
Hidrólisis de la arginina:.....	14
Crecimiento a 42°C:.....	14
Identificación bioquímica de otros géneros bacterianos.....	15
Pruebas para enterobacterias:.....	15
Pruebas para grampositivos:.....	15
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para Pseudomonas sp.:.....	15
Concentración mínima inhibitoria (CMI):.....	16
Preparación de la solución Stock:.....	16
Preparación del Agar Mueller Hinton (AMH):.....	17
Preparación de AMH con antibiótico:	17
Estandarización del inóculo bacteriano:	17
Antagonismo bacteriano:	18
Análisis de los resultados:.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA	37
HOJA DE METADATOS	44

DEDICATORIA

A:

Dios todo poderoso, por darme fuerza, voluntad y sabiduría para llevar a cabo uno de mis más grandes sueños.

Mis padres Sonsire Chópite y Jesús Barrios, que durante toda mi vida se han esforzado por apoyarme en todas mis decisiones. Los amo.

Mis hermanos, Jenice, Jenira y Jesús E. Barrios, nunca dudaron de mí; sé que esto es lo que querían para su hermanita. Los amo.

La luz al final del túnel, Senovia Chópite, por enseñarme cada día que las metas son alcanzadas con constancia, disciplina y paciencia.

Mis sobrinas, Claudia María, Clariangel Valentina y Salma Valentina, espero servirles de ejemplo.

Mis compañeras de estudios Patricia Pérez, Patricia Vásquez y Olymar Marchán, gracias por permitirme entrar en su vida y ser parte de su familia.

Eliosmar Rodríguez, por su paciencia, tolerancia y comprensión. Te quiero mucho.

Mis compañeras de laboratorio, Adriana Rojas, Patricia Pérez y Marielys González, de las cuales siento orgullo de haber compartido la realización de esta investigación, gracias por estar allí en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Al término de este trabajo de investigación sobran los agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que con su pequeño, gran y muy significativo aporte lo hicieron posible. Quisiera en primer lugar dar gracias a la Dra. Yasmina Araque, sin sus conocimientos, apoyo, confianza y seguridad no hubiese sido posible llevar a cabo este trabajo.

A la profesora Dina Antón por depositar su confianza en mí y abrirme las puertas del Laboratorio de Investigaciones Bacteriológicas, lugar donde se llevó a cabo una de las etapas de realización de esta investigación y por su valiosa colaboración en el procesamiento de las muestras. Eternamente agradecida.

Al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas dirigido por la Dra. Sara centeno, quien prestó su laboratorio para el procesamiento de las muestras, así como también a las profesoras de Bacteriología Clínica Elsa Salazar y Militza Guzmán, gracias por brindarme sus conocimientos, colaboración y apoyo.

A todo el personal que trabaja en el Laboratorio de Bacteriología Clínica; técnicos, preparadores y compañeros tesistas (Diorelis, Sophia, Suyín, Jhonilys y Rosimir), de quienes tuve la oportunidad de aprender técnicas y conocimientos diferentes cada día.

A la Universidad de Oriente y todos mis profesores.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diversidad de bacterias heterótrofas presentes a nivel de las estaciones de muestreo del río Manzanares, estado Sucre.....	23
Tabla 2. Presencia de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF) en las estaciones de muestreo del río Manzanares, estado Sucre.....	25
Tabla 3. Características bioquímicas de las cepas del género <i>Pseudomonas</i> aisladas de las estaciones muestreadas del río Manzanares, estado Sucre.....	26
Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes del río Manzanares.	27
Tabla 5. Efecto antagónico producido por las sustancias extracelulares de <i>Pseudomonas</i> spp. provenientes de muestras de agua del río Manzanares, estado Sucre frente a cepas del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM).....	29
Tabla 6. Efecto antagónico producido por las sustancias extracelulares de <i>Pseudomonas</i> spp. provenientes de muestras de agua del río Manzanares, estado Sucre, frente a cepas bacterianas aisladas de este mismo ambiente.	31
Tabla 7. Relación del efecto antagónico con el perfil de susceptibilidad de las especies de <i>Pseudomonas</i> aisladas del río Manzanares.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción general de la cuenca hidrográfica del río Manzanares.....	10
Figura 2. Rangos de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) en las diferentes estaciones de muestreo del río Manzanares, estado Sucre.....	20
Figura 3. Efecto antagónico de sustancias extracelulares producidas por aislados del género <i>Pseudomonas</i> provenientes del río Manzanares, estado Sucre. A: Bacteriocina producida por <i>P. aeruginosa</i> (J015) proveniente del río Manzanares frente a <i>P. aeruginosa</i> CVCM 787. B: Comparación entre un antagonismo positivo (presencia de halo) por parte de <i>P. stutzeri</i> (J 020) y negativo (ausencia de halo) frente a <i>A. hydrophila</i> proveniente del río Manzanares.	33

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron muestras de agua a nivel de tres estaciones, las Fraguas, los Dos Ríos y detrás del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná, cuyo propósito fue caracterizar la presencia de sustancias extracelulares en aislados de *Pseudomonas* sp., provenientes de la cuenca del río Manzanares. La identificación bacteriana se realizó a través de pruebas bioquímicas convencionales. La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en agar, recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) empleando: imipenem (IPM), gentamicina (GM), amikacina (AMK), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP) y ticarcilina (TIC). Para caracterizar la presencia de sustancias extracelulares del género *Pseudomonas* se empleó la técnica de doble capa. Se encontró un total de 16 cepas perteneciente al género *Pseudomonas*, 29 a *Staphylococcus*, 25 a enterobacterias y 35 del género *Aeromonas*. Los aislados de *P. aeruginosa* fueron resistentes a TIC y una sola cepa a CAZ; *P. fluorescens* mostró resistencia a CIP; mientras que, *P. stutzeri* resultó resistente a CAZ y TIC. Del total de aislados pertenecientes al género *Pseudomonas*, siete (7) produjeron sustancias extracelulares antagónicas que inhibieron a *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 636; seis (6) inhibieron a *P. aeruginosa* CVCM 787 y tres (3) lograron inhibir a *E. coli* K12 CVCM 178. Al enfrentar *Pseudomonas* sp. provenientes del río contra las cepas aisladas de este mismo medio acuático, se obtuvo que siete (7) cepas lograron inhibir a *A. hydrophila*, cinco (5) cepas inhibieron a *S. aureus* y una (1) cepa inhibió a *E. cloacae* y *P. aeruginosa*. Las cepas de *Pseudomonas* aisladas del río Manzanares produjeron sustancias extracelulares antagónicas, las cuales pudieran emplearse como estrategia de control biológico de la densidad bacteriana en este tipo de ambientes, debido a su capacidad de inhibir especies patógenas aisladas del mismo.

Palabra y/o Frases Claves: Antagonismo, *Pseudomonas*, Río Manzanares.

INTRODUCCIÓN

Los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF) son un grupo de microorganismos aerobios, no esporulados, que degradan los hidratos de carbono por vía oxidativa. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza: aguas, plantas, suelos húmedos, mucosas y tracto digestivo de hombres y animales (Koneman *et al.*, 2004). Dentro del grupo de los BGNF se encuentran: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Chryseobacterium*, entre otros; siendo el género *Pseudomonas* el de mayor importancia clínica y *P. aeruginosa* es la especie patógena aislada con mayor frecuencia en muestras humanas (Castillo, 2000).

Esta especie ha sido identificada como el agente causal de infecciones intrahospitalarias tales como septicemias, meningitis, endocarditis bacteriana, oculares, heridas, quemaduras, del tracto respiratorio superior y de las vías urinarias, especialmente, en individuos inmunosuprimidos. Es considerado además un patógeno oportunista, causante principal de mortalidad en pacientes con fibrosis quística, enfermedades neoplásicas y quemaduras severas (Jones *et al.*, 2002). Otras especies como *P. fluorescens* y *P. putida* son recuperadas con menor frecuencia de muestras humanas; sin embargo, *P. fluorescens* es considerada igualmente como típico patógeno oportunista para el hombre, asociada a septicemia, ocasionada por diversas causas como: heridas, transfusiones sanguíneas, infección post-operatoria y enfermedades inflamatorias de la pelvis. Por su parte, *P. putida* ha sido asociada igualmente a septicemias, transfusiones de sangre, además de bacteriuria y bacteriemia, debido a contaminaciones intravasculares (Esnard y Díaz, 1997).

El género *Pseudomonas* está conformado por especies bacterianas que poseen la habilidad de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, incluyendo compuestos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos; capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales, resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos, por lo que se pueden

encontrar tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos y son importantes como patógenos de plantas, animales y humanos (Palleroni, 2005). Dentro de este género, otras especies pueden ser recuperadas habitualmente de muestras de suelo, aguas cristalinas y contaminadas, tal es el caso de *P. syringae*, *P. putida* y *P. alcaligenes*, mayormente descritos como patógenos de plantas y colonizadores de aguas y tierras; mientras que, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* son patógenos oportunistas en humanos y animales (Madigan y Martinko, 2005).

Los miembros de esta familia poseen la característica de ser bacilos gramnegativos no esporulados, rectos o ligeramente curvos, que miden aproximadamente 1,5 a 5,0 μm de largo, con un diámetro de 0,5 a 1,0 μm ; aerobios estrictos, la mayoría de las cepas son móviles por medio de uno o varios flagelos polares. En los últimos años ha tenido lugar una reorganización taxonómica de las especies que constituían el género *Pseudomonas*; ubicando a este género en el reino Procariotae, orden Pseudomonadales, familia *Pseudomonadaceae* y género *Pseudomonas*. Anteriormente la familia estaba conformada por cinco grupos según la homología de ARNr (Grupos I, II, III, IV y V ARNr). Actualmente sólo los miembros del grupo I de ARNr, constituido por las especies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* y *P. pseudoalcaligenes* retienen la designación de género de *Pseudomonas*; de las cuales, las especies del grupo fluorescente (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*) son las únicas productoras de pigmentos hidrosolubles fluorescentes como la pioverdina y piocianina (Koneman *et al.*, 2008), así como también, piorrubina y piomelanina de color rojo oscuro o marrón, soportan una gama muy variada de condiciones adversas, como temperaturas elevadas, cloración intensa, y son capaces de crecer entre 4 y 43°C (Madigan y Martinko, 2005).

Utilizan la glucosa y otros carbohidratos oxidativamente, y por lo general, son oxidasa y catalasa positivos, la mayoría no crecen en condiciones ácidas (pH menor a 4,5); crecen muy bien en agar Mac Conkey como no fermentadores de la lactosa y degradan el nitrato en nitrito o en nitrógeno gas, además, muchas especies son capaces de utilizar alcoholes y aminoácidos como fuente de carbono (Koneman *et al.*, 2004).

Su metabolismo es siempre respiratorio, con una variabilidad nutricional muy amplia que se traduce en la capacidad de utilizar, como fuente de carbono, diversos substratos que le permiten 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 ha permitido que sean una excelente alternativa para el tratamiento de contaminaciones ambientales producidas por la acumulación de metales pesados o compuestos xenobióticos, en suelos y aguas contaminadas, contribuyendo al reciclaje biológico de materia orgánica (Hardalo y Edberg, 1997).

La versatilidad metabólica se debe en gran parte a la presencia de un gran número de plásmidos para la síntesis de enzimas específicas que permiten a la bacteria catabolizar los compuestos presentes en el medio (Hardalo y Edberg; 1997; Kado, 1998). Los plásmidos presentan genes que codifican nuevas propiedades capacitando a la célula receptora de funciones que inicialmente no estaban presentes, tales como la resistencia a drogas, metales pesados, agentes físicos, producción de antibióticos y bacteriocinas; también, asociados a factores de virulencia, entre otros (Alonso *et al.*, 2000; Narváez *et al.*, 2005).

Dentro de la amplia variedad de metabolitos y sustancias extracelulares producidas por bacterias del género *Pseudomonas*, se destacan las bacteriocinas, las cuales son sustancias de naturaleza química heterogénea, constituidas principalmente, por un componente proteico esencial, al que se unen: carbohidratos, lípidos, fosfatos y ADN en ciertas excepciones, según el tipo de bacteriocina (Pitt y Gaston, 1995). También, se han definido a las bacteriocinas como proteínas bacterianas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora; sin embargo, este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon *et al.*, 2000). Poseen actividad antimicrobiana y juegan un rol importante en el

ecosistema, principalmente, en la competencia por el nicho ecológico entre cepas del mismo o diferente género (García, 1992).

Aquellas bacterias que viven en un entorno competitivo, son capaces de secretar toxinas proteínicas, las cuales pueden inhibir bacterias estrechamente relacionadas, sin que las células productoras sufran ningún daño. Estas bacterias inhibidoras están presentes en todos los grupos principales de bacterias (Riley y Wertz, 2002).

La producción de bacteriocinas ha sido reportada desde complejas sustancias antibacterianas como la syringacina producida por *P. syringae*, las cuales se localizan exclusivamente en el cromosoma bacteriano (Smith y Vidaver, 1982); así como también en polipéptidos de tamaño medio como las colicinas de *E. coli* (Lakey y Slatin, 2001) y sus homólogos (piocinas de tipo R y F) de *P. aeruginosa* (Michel-Briand y Baysse, 2002). Estas proteínas, las cuales constituyen un grupo estructural y funcionalmente diverso dentro de los antimicrobianos, van desde pequeños péptidos secretados bajo condiciones estrictas hasta sustancias antibióticas producidas tanto por grampositivas como gramnegativas (Hechard y Sahl, 2002; Jack y Jung, 2000).

Los nuevos métodos de extracción y purificación de sustancias inhibitorias activas, ha permitido conocer la naturaleza química de éstas, encontrándose desde lipopolisacáridos, glicoproteínas termolábiles hasta compuestos proteínicos y todos con un amplio espectro de actividad inhibitoria (León *et al.*, 2005).

Se cree que el mecanismo de acción de las bacteriocinas es a través de la formación de poros en la membrana de la célula bacteriana, degradación inespecífica del ADN celular, división de la subunidad 16S del ARNr, o por la inhibición de la síntesis del péptidoglicano resultando en lisis celular (Riley, 1998).

Padilla *et al.* (2002) mencionan que en bacterias gramnegativas las bacteriocinas son absorbidas directamente por el péptidoglicano y luego se trasladan a la membrana

citoplasmática donde produce su actividad letal en la célula receptora. En bacterias grampositivas el proceso es más complejo debido a que la bacteriocina se debe unir a receptores en la membrana externa de las células sensibles, luego éstas pasan al péptidoglicano para desestabilizar y aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática, por medio de la formación de poros transitorios o canales iónicos que causan lisis o reducción de la fuerza motriz de la célula (Grande *et al.*, 2005).

La inserción de la bacteriocina dentro de la célula y la formación del poro, está relacionada con la composición y distribución de los fosfolípidos de la membrana de la célula receptora, es debido a este fenómeno que en ciertas ocasiones algunos microorganismos son resistentes a las bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2001).

Las interacciones antagónicas de tipo bacteria-bacteria que involucran la inhibición del crecimiento, corresponden a un mecanismo que puede ayudar a mantener la integridad de especies bacterianas a microescala (Long y Azam, 2001); en la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias (Riley y Wertz, 2002), éstas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas y aún dentro de una misma especie podrían ser producidas diferentes tipos de bacteriocinas (Mackay *et al.*, 1997).

Un gran número de bacteriocinas han sido identificadas y caracterizadas en distintos grupos de acuerdo con su masa molar y estabilidad al calor, mostrando un amplio o reducido campo de acción antimicrobiano (Cintas *et al.*, 2001). Poseen la función de capacitar a las bacterias productoras para sobrevivir frente a competidores, por lo que éstas podrían servir como antagonistas que impiden la colonización de una cepa dentro de una comunidad microbiana establecida (Arquéz, 2003).

Las bacterias marinas han sido citadas por diversos autores por su habilidad de mantener un perfecto equilibrio ecológico en su entorno y porque constituyen un recurso potencial de producción de nuevas sustancias antimicrobianas (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981; Lemos *et al.*, 1985; Fenical, 1993). Estas sustancias, producto de

las interrelaciones entre microorganismos marinos podrían ser de gran utilidad en el control de patologías humanas (Lodeiros *et al.*, 1989). En este contexto, microorganismos marinos, macroalgas y algunos invertebrados han sido descritos como productores de metabolitos biológicamente activos, razón por la cual, el mundo marino se considera una fuente de sustancias bioactivas (Stierle *et al.*, 1988).

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, se hace a través de los sistemas agrícolas, o tal vez, debido a una inadecuada utilización de esas fuentes de agua por parte del ser humano, ocasionando un problema de salud pública (Romero y Salas, 1993).

Los adelantos biotecnológicos se han abocado al empleo de microorganismos que permitan el biocontrol y biorremediación de ambientes contaminados, ya sea por desechos industriales, compuestos organofosforados u organoclorados, con el fin de neutralizar estas sustancias tóxicas o bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de sustancias orgánicas por parte de dichas bacterias naturales o genéticamente mejoradas, las cuales emplean estos sustratos como fuente de energía para sus funciones metabólicas y de desarrollo (Torres, 2003).

Las bacterias empleadas en las nuevas técnicas de biotecnología para la recuperación de ambientes contaminados, por lo general, involucran el uso de una microflora aislada de estos mismos ambientes impactados; siendo hasta los momentos los géneros más utilizados: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* (Johsen *et al.*, 2002). *Pseudomonas* posee la habilidad de utilizar diversos sustratos, incluyendo el petróleo y los xenobióticos (Rockne *et al.*, 2000). De

igual manera, el tratamiento de descontaminación originada por la acumulación de metales pesados, insecticidas y herbicidas ha sido posible, mediante la utilización de bacterias del género *Pseudomonas*, dicha efectividad de degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto y a su versatilidad fisiológica (Vásquez y Reyes, 2002).

El río Manzanares drena una cuenca agrícola caracterizada, principalmente, por cultivos de caña de azúcar. En la década de los setenta se comenzaron a asociar los problemas de contaminación del río con los aportes de los efluentes del central azucarero de Cumanacoa (Ochoa, 1971). Toda la cuenca está afectada por actividades agrícolas, urbanas e industriales, que aportan grandes cantidades de contaminantes a la zona costera. Los primeros estudios sobre este río se basaron en: el origen y comportamiento de los elementos nutritivos, niveles de materia orgánica y estudios bacteriológicos (Senior y Godoy, 1990; Godoy, 1991). Estudios llevados a cabo en la década de los noventa han demostrado que la calidad de las aguas del río Manzanares desde Cumanacoa hacia su desembocadura en Cumaná, ha sido alterada como consecuencia del aumento de productos industriales, agrícolas y a las crecientes actividades antropogénicas en la zona, esto aumenta progresivamente, al igual que los niveles de materia orgánica, organismos coliformes y metales pesados en las aguas costeras cerca de la ciudad de Cumaná (Márquez *et al.*, 2000).

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) advierte la necesidad imperativa y urgente de crear programas de monitoreos continuos de los ecosistemas acuáticos, especialmente, ríos y aguas costeras, para obtener información que permita diseñar planes de control ordenación, manejo y uso debido de los cuerpos de agua (Ress, 1993; Taylor, 1993). Dentro de las estrategias empleadas como recurso de depuración ambiental se tienen a las bacterias propias de esos ambientes como posibles candidatas de biocontrol y

biorremediación.

El propósito del presente trabajo fue estudiar aislados de *Pseudomonas* sp. provenientes del río Manzanares y determinar la capacidad antagónica de estas cepas, con el fin de aplicar, a futuro, estrategias de biocontrol y biorremediación en este cuerpo de agua, utilizando la microflora existente en su mismo cauce, lo cual permitirá a mediano y largo plazo, por medio de la utilización de sustancias inhibitorias, descontaminar el río, y así contrarrestar el daño que causan patógenos entéricos y oportunistas a la población, debido a las frecuentes descargas de contaminantes, producto de las diversas actividades comerciales, agropecuarias e industriales que constituyen un problema de contaminación y salud pública, lo cual trae como consecuencia daños irreversibles en el ecosistema que amenaza el perfecto equilibrio ecológico.

METODOLOGÍA

Descripción del área geográfica:

La cuenca del río Manzanares está ubicada en la región Nor-oriental de Venezuela, en el estado Sucre. Tiene su nacimiento en el macizo montañoso del Turimiquire, en la cordillera de la costa, a 2 300 m de altitud, con una longitud de cauce de 81 km que drena una cuenca de poco más de 1 000 km². Su cuenca se encuentra ubicada entre las coordenadas 10° 05' 30" y 10° 29' 20" latitud norte y 63° 45' 30" y 63° 19' 20" longitud oeste. Recibe por sus márgenes derechos 9 ríos, 13 riachuelos y quebradas y, por el margen izquierdo, 14 ríos principales y 6 secundarios (Figura 1) (CENDES, 1987). Este río integra, conjuntamente con los ríos Neverí y Guarapiche, el sistema fluvial de la costa oriental venezolana. Desemboca en la entrada del Golfo de Cariaco, ejerciendo una gran influencia hacia el lado oeste de la costa de Cumaná;

En su recorrido irriga diversos centros poblados dedicados en su mayoría a la agricultura, caracterizada, principalmente, por el cultivo de caña de azúcar, en Cumanacoa, San Salvador, Arenas, San Lorenzo y Quebrada Seca. Toda su cuenca, desde Cumanacoa hasta su desembocadura, está afectada por actividades agrícolas, urbanas e industriales que aportan grandes cantidades de contaminantes a la zona costera (Márquez *et al.*, 2002). Según el censo del 2001, alrededor de las riberas del Manzanares se encontraban unos 786 483 habitantes, número que se ha incrementado en los últimos años (INE 2001).

Estaciones de muestreo:

Las muestras de agua para este estudio se recogieron en 3 estaciones diferentes seleccionadas al azar, tomando en cuenta la accesibilidad a los sitios de muestreo y las actividades antropogénicas llevadas a cabo en sus cercanías, por lo que los muestreos se

realizaron en las siguientes estaciones: detrás del mercado municipal de la Ciudad de Cumaná, Los dos Ríos y Las Fraguas, designadas como E1, E2 y E3 respectivamente.

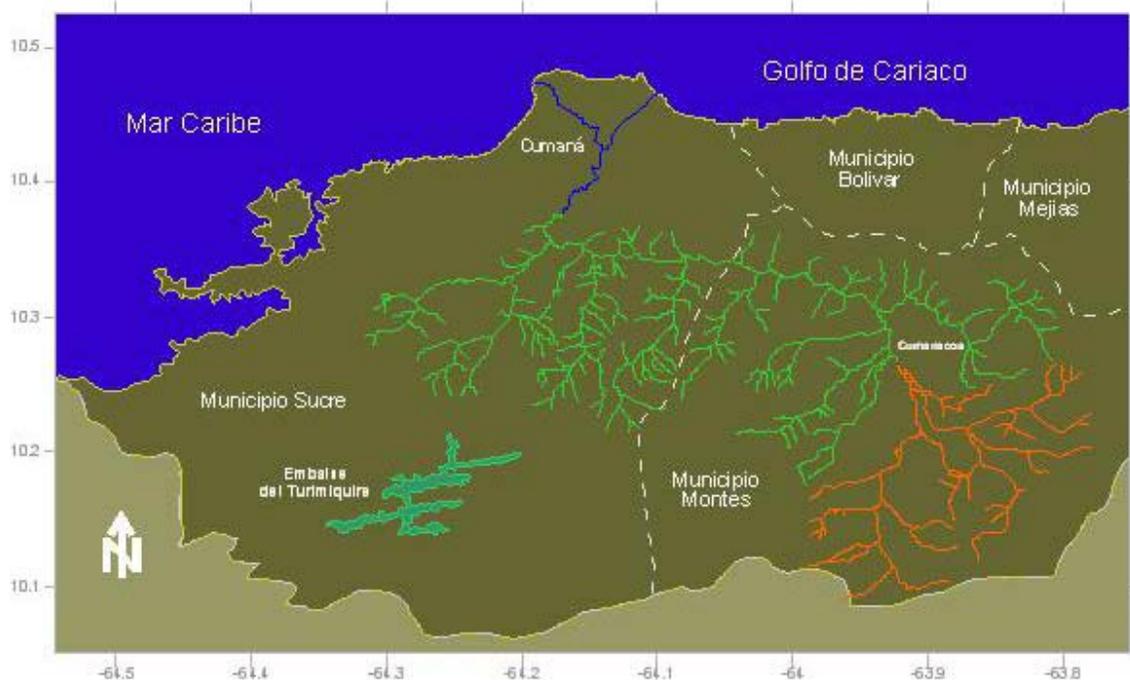


Figura 1. Descripción general de la cuenca hidrográfica del río Manzanares.

Recolección de las muestras de agua:

Se realizaron 3 muestreos por duplicado en diferentes estaciones del río Manzanares, estos se llevaron a cabo en los meses de febrero, abril y junio del 2008 en intervalos de 2 meses, siguiendo el método descrito por Milne (1989). Las muestras se recolectaron en envases de vidrio esterilizados, aproximadamente, 250 ml de agua. El recipiente fue sostenido por la base e introducido bajo la superficie del agua unos 20 a 30 cm, una vez recolectada la cantidad de agua necesaria, se tapó el recipiente dentro del agua. Posteriormente, fue trasladado al Laboratorio de Investigaciones Bacteriológicas de la escuela de Bioanálisis en cavas con hielo para evitar la proliferación y crecimiento bacteriano.

Dilución de las muestras de agua:

A cada una de las muestras de agua provenientes de las diferentes estaciones de muestreo se les realizaron diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁹ en caldo Luria Bertani (LB); tomando 1 ml de la muestra de agua y diluyendo esta alícuota en 9 ml de caldo LB. Luego, a partir de las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷, se transfirió 1 ml de cada una de estas diluciones en 15 ml de agar LB fundido a una temperatura de 35°C; acto seguido se agregó esta dilución en placas de petri estériles, previamente identificadas, las cuales fueron incubadas a 32°C, en aerobiosis durante 24, 48 y 72 horas (Wollum, 1994); transcurrido el tiempo requerido para el crecimiento de las colonias provenientes de las respectivas diluciones, se procedió a realizar el conteo de las colonias bacterianas aisladas en cada estación y a la selección de las colonias de interés.

Caracterización morfológica de las colonias:

Transcurrida la incubación, se realizó la caracterización macroscópica de las colonias seleccionadas en base a su aspecto, consistencia, tamaño, forma y producción de pigmentos, característico de algunas especies del género *Pseudomonas* (Koneman et al., 2004).

Identificación microscópica:

Las colonias seleccionadas se colorearon aplicando la tinción de Gram modificada por Hucker en el año 1927, las cuales fueron observadas bajo el microscopio a objetivo de 100X para comprobar la presencia de Bacilos gramnegativos dispuestos de manera irregular, característicos del género *Pseudomonas*, así como la variedad morfológica existente y para verificar la pureza de las colonias seleccionadas (Koneman et al., 2004).

Subcultivo en medio Mac Conkey y agar LB:

Las colonias de interés, se sembraron en agar LB y agar Mac Conkey y se incubaron por 24 hasta 72 horas, a una temperatura de 32°C, en aerobiosis.

Caracterización Bioquímica de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF):

A partir de cultivos jóvenes en el agar Mac Conkey, se preparó un inóculo denso en caldo infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) para la identificación del género *Pseudomonas* y otros BGNF de acuerdo a la metodología descrita por Koneman et al. (2004), utilizando como controles las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922.

Prueba de la oxidasa:

Se tomó con un palillo de madera una colonia procedente de agar LB y se colocó sobre un papel de filtro previamente impregnado en el reactivo tetrametil p-fenilendiamina. La presencia de color púrpura reveló que se trataba de bacterias oxidasa positivas, sugestivas del género *Pseudomonas*, a las que posteriormente se les realizaron las pruebas bioquímicas descritas a continuación:

Agar hierro triple azúcar:

Este es un medio diferencial, el cual fue inoculado por medio de punción y estrías con el inóculo de BHI previamente preparado. Este medio se empleó para observar la degradación de los hidratos de carbono: glucosa y lactosa; así como también, producción de ácido sulfhídrico (H₂S) y gas, evidenciado por el ennegrecimiento del medio y la presencia de burbujas, o ruptura del medio respectivamente. Los resultados, producto de la degradación de los carbohidratos observados en el medio fueron: alcalino/ácido, lo cual indicó que el microorganismo solamente fermentó la glucosa, ácido/ácido reflejó la presencia de microorganismos que fermentaron glucosa y lactosa. En el caso de las bacterias no fermentadoras de los azúcares el resultado fue alcalino/alcalino, sugestivo del género *Pseudomonas*.

Agar motilidad:

El medio motilidad permite diferenciar microorganismos móviles de los inmóviles. La interpretación de la capacidad móvil por parte de los microorganismos en este medio se llevó a cabo a través de la observación macroscópica del mismo en busca de una zona de crecimiento a partir de la línea de inoculación, las bacterias del género *Pseudomonas* crecen bien sólo en presencia de oxígeno, por lo tanto, produjeron una película que se diseminó en la superficie del agar hasta la parte media del tubo y no en la parte más profunda por ausencia de oxígeno.

Prueba de utilización de carbohidratos O/F para no fermentadores (glucosa, maltosa, manitol y sacarosa):

Los microorganismos sacarolíticos degradan la glucosa ya sea por vía fermentativa u oxidativa. Los productos finales de la fermentación de los carbohidratos son ácidos mixtos relativamente fuertes, mientras que los ácidos, producto de la oxidación de la glucosa, son extremadamente débiles, por tanto, se empleó el medio O/F Hugh-Leifson, el cual contiene menos concentración de peptonas y mayor cantidad de carbohidrato (proporción 1:5), maximizando la cantidad de ácidos que puedan formarse para que ocurra el viraje de color de verde a amarillo. Este medio fue sembrado inoculando dos tubos por cada cepa, para cada carbohidrato a utilizar, de los cuales, uno se cubrió con 1 ml de parafina líquida. El metabolismo aerobio del género *Pseudomonas* degradó los carbohidratos por vía oxidativa, evidenciándose por el viraje de color del medio de verde a amarillo iniciando en la superficie del tubo, como consecuencia de la acidificación producida por el consumo aerobio de los carbohidratos contenidos en el mismo, mientras que el medio con parafina permaneció de color verde.

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 alcalinas. Las bacterias que tienen la capacidad de producir la enzima lisina descarboxilasa son

capaces de remover la molécula de CO₂ del aminoácido lisina para formar cadaverina. El caldo Moeller descarboxilasa fue la base que se empleó para evidenciar la producción de esta enzima y a la cual se le adicionó el aminoácido al 1%; esta base posee una pequeña cantidad de glucosa, la cual, la bacteria pueda degradar hasta acidificar el medio (viraje a amarillo) y con esto inducir la producción de las enzimas descarboxilasas, que provocan la alcalinización del medio, lo que se evidencia por un cambio de color nuevamente a púrpura. Este caldo fue sembrado añadiendo 3 gotas de un inóculo denso de caldo de cultivo BHI de cada cepa en estudio, y posteriormente, se agregó aproximadamente 1 ml de parafina líquida y se incubaron a 32°C por 24 horas. El género *Pseudomonas* tiene la particularidad de no producir descarboxilación de la lisina, evidenciado por una coloración ligeramente amarilla tras la incubación.

Hidrólisis de la arginina:

La conversión de la arginina en citrulina es más una reacción de dihidrolasa que de descarboxilasa, en la cual un grupo amino es removido de la arginina para formar citrulina que es convertida en ornitina, la que es descarboxilada para formar putrescina. Para la realización de esta prueba se utilizó la base caldo Moeller a la cual se le adicionó L-arginina al 1%. Al igual que en la descarboxilación de la lisina, ocurre un viraje de color del medio a amarillo producto de la acidificación por conversión de la glucosa en ácidos; si las bacterias hidrolizan la arginina el medio se torna de su color original (púrpura), consecuencia de la producción de aminas y alcalinización del mismo. Las cepas de interés fueron sembradas en los caldos añadiendo 3 gotas de un inóculo denso de BHI. Posteriormente, se les agregó parafina líquida para proporcionar las condiciones de anaerobiosis, se incubó a 32°C por 24 horas. Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* poseen la capacidad de hidrolizar a la arginina, evidenciándose con un viraje de color de púrpura a amarillo y nuevamente a púrpura.

Crecimiento a 42°C:

Constituye una prueba diferencial entre las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y más específicamente entre especies del grupo fluorescente, donde se

verifica la capacidad de las bacterias de crecer a altas temperaturas. Esta prueba se realizó por medio de la siembra de las cepas de interés en caldo BHI, del mismo modo que las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 (control positivo) y *E. coli* ATCC 25922 (control negativo), luego se incubaron a 42°C en baño de maría durante 30 minutos y posteriormente, se sembraron estos inóculos en agar Mac Conkey y se incubaron por 24 y 48 horas a 32°C. Considerando negativo la ausencia de colonias y positivo aquellas donde hubo crecimiento de colonias bacterianas.

Identificación bioquímica de otros géneros bacterianos

Pruebas para enterobacterias:

Para la identificación a nivel de género y especie de las diferentes colonias aisladas que resultaron ser oxidasa negativas, sugestivas de enterobacterias, se emplearon los protocolos de pruebas bioquímicas descritos por Koneman et al., (2004): Fermentación de azúcares en agar hierro triple azúcar (TSI), verificación de motilidad, producción de indol y descarboxilación de la ornitina en medio MIO, producción de enzima ureasa, utilización del citrato, descarboxilación de la lisina, rojo de metilo, sorbitol e inositol. Todas estas pruebas fueron inoculadas a partir de cultivos de 24 horas en agar Mac Conkey e incubadas a 32°C durante 24 horas.

Pruebas para grampositivos:

Para la identificación de géneros y especies de las diferentes colonias que presentaron características de cocos grampositivos aislados, se realizaron las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de cocos sugestivas de *Staphylococcus* empleando las pruebas bioquímicas descritas por Koneman et al. (2004): catalasa, coagulasa, ADNasa y fermentación del manitol.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *Pseudomonas* sp.:

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana fue realizada por el método de difusión en agar, descrito por Bauer et al. (1966), siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, 2007) y empleando como control la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. Se procedió a preparar un inóculo en 5 ml de solución salina fisiológica (ssf) equivalente a un patrón de 0,5 de Mac Farland, inoculando el mismo con, aproximadamente, 3 colonias aisladas de las cepas de interés, provenientes del agar Mac Conkey, estos fueron incubados a 32°C, hasta observar una turbidez semejante a la del patrón. Posteriormente, se realizó la siembra de la suspensión de bacterias en el agar Mueller Hinton, con la ayuda de un hisopo humedecido en esta suspensión, se diseminó en la superficie del agar, luego, se colocaron los discos de antibióticos con la ayuda de una pinza y haciendo un poco de presión. Los antibióticos empleados fueron los siguientes: ceftazidima (75µg), imipenem (10µg), ciprofloxacina (5µg), polimixina B (300U), amikacina (30µg), gentamicina(10µg) y ticarcilina (75µg). Una vez terminado el antibiograma se procedió a incubar las placas a 32°C, por 24 horas, en aerobiosis. Trascurrido este tiempo se procedió a medir los halos de inhibición y a clasificar sus medidas de acuerdo con las categorías establecidas por el CLSI (2007), en sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) para cada uno de los antibióticos correspondientes.

Concentración mínima inhibitoria (CMI):

Para la determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) se empleó el método de dilución en agar Mueller Hinton (AMH), siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, 2007), se empleó como cepa control: *P. aeruginosa* ATCC 27853. El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

Preparación de la solución Stock:

Se diluyó 1 g del compuesto activo de antimicrobiano en 20 ml de agua destilada estéril, con lo que se obtuvo una concentración de 50 mg/ml (Fórmula 1). A partir de la misma, y por medio de fórmulas matemáticas, se calculó la cantidad en µl de

antimicrobiano a utilizar para preparar 10 ml de solución Stock a 5120 µg/ml (Fórmula 2). Una vez preparado, se tomaron alícuotas de 3 ml y se hicieron diluciones seriadas en 3 ml de solución salina estéril, para así obtener los patrones a diferentes concentraciones de los antibióticos empleados (2 560, 1 280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0,625 µg/ml).

Fórmula 1:

$$c = \frac{m}{v}$$

Fórmula 2: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$C_1 = 50 \text{ mg/ml}$, $C_2 = 5120 \text{ µg/ml}$, $V_2 = 10 \text{ ml}$, $V_1 = ?$

Preparación del Agar Mueller Hinton (AMH):

Se procedió a preparar el AMH de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. Se preparó una placa con 20 ml de AMH, sin antibiótico, que se empleó como control de crecimiento de las cepas, tanto en estudio, como de los controles.

Preparación de AMH con antibiótico:

Como establece el Manual de procedimientos de Sensibilidad a los antimicrobianos WHO Global Salm Surv (2008), basándose en lo establecido por el CLSI (2007), se realizó una dilución 1/20; es decir, 1 ml de los patrones de antimicrobianos previamente realizados con 19 ml de AMH, los cuales fueron vertidos en placas estériles y una vez solidificados, se obtuvieron las placas con AMH y antimicrobiano a las diferentes concentraciones.

Estandarización del inóculo bacteriano:

Se inocularon de 3-4 colonias aisladas en 5 ml de ssf, hasta alcanzar la turbidez 0,5 Mac Farland, posteriormente, se realizó una dilución 1/10 de la suspensión

bacteriana a 0,5 Mac Farland, transfiriendo 0,1 ml de cada inoculo a 0,9 ml de SSF de esta manera, se obtuvo una suspensión de, aproximadamente, 1×10^7 ufc/ml. Sobre las placas de AMH con antibiótico solidificadas y a diferentes concentraciones de antimicrobiano, se inocularon 10 μ l de cada cepa en estudio y de las cepas control. Una vez culminado el proceso de inoculación, se procedió a incubar las placas a 32°C, por 24 horas, en aerobiosis. Trascurrido el tiempo de incubación, se verificó el crecimiento o ausencia de crecimiento por parte de las bacterias en AMH con antibióticos en sus respectivas concentraciones.

Antagonismo bacteriano:

Una vez identificadas las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, se procedió a determinar el efecto antagónico de las sustancias extracelulares producidas por los aislados de *Pseudomonas* sp., según la metodología de doble capa, descrita por Dopazo et al. (1988). Los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron enfrentados con cepas indicadoras provenientes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM): *Escherichia coli* K12 CVCM 178, *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 787, *Bacillus subtilis* CVCM 591 y *Staphylococcus aureus* CVCM 636, dichas cepas fueron subcultivadas previamente en los correspondientes medios diferenciales para ellas, a su vez fueron enfrentadas con los 4 géneros bacterianos mayormente aislados de la cuenca del río Manzanares. El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

Las cepas en estudio (posibles productoras) se sembraron en agar LB y se incubaron en aerobiosis durante 24 horas a 32°C. Posteriormente, se resuspendieron de 3 a 5 colonias en 5 ml de ssf hasta alcanzar una turbidez equivalentes a un patrón de 0,5 en la escala Mac Farland. A partir de las diferentes suspensiones, se inocularon 10 μ l de las posibles productoras sobre un espacio determinado en placas con 20 ml de agar LB, tratando de mantener la forma circular de la gota e inoculando un máximo de 4 cepas (posibles productoras) por placa de manera equidistante. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 32°C por un período de 18 a 24, horas en aerobiosis.

Trascurrido el tiempo de incubación, las cepas sembradas (posibles productoras) se expusieron a vapores de cloroformo por 20 minutos y luego, se cubrió cada placa con 8 ml del agar LB fundido, que previamente se inoculó con 100 μ l de las cepas indicadoras, esto se aplicó para cada cepa provenientes del CVCM y con los diversos géneros bacterianos, mayormente aislados de la cuenca del río Manzanares. Una vez colocada la sobrecapa de agar en las placas, y solidificado, las mismas fueron reincubadas por 24 horas a 32°C, en aerobiosis, para poder observar la presencia y/o ausencia de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de las colonias de *Pseudomonas*. Para la lectura e interpretación del efecto antagónico de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, se empleó una regla milimétrica y se interpretó como productora del efecto antagónico, aquella donde se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de cualquier diámetro.

Análisis de los resultados:

Los resultados obtenidos fueron expresados a través de gráficas y/o tablas. Los patrones de susceptibilidad antimicrobiana se expresaron en porcentajes de resistencia y sensibilidad. Las concentraciones mínimas inhibitoria de los aislados de *Pseudomonas* sp. se expresaron en μ g/ml, y los halos de inhibición del efecto antagónico en milímetros (mm). Para relacionar el efecto inhibitorio de las cepas productoras de sustancias tipo antibiótico con la susceptibilidad antimicrobiana, se procedió a realizarla prueba Chi cuadrado (χ^2) (Sokal y Rolf, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluaron muestras de agua, provenientes de la cuenca del río Manzanares a través de estudios bacteriológicos, con la finalidad de determinar la diversidad de cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* productoras de sustancias extracelulares y con actividad antagónica.

Se pudo evidenciar un mayor contaje en la Estación 1 (E1) comprendido entre $1,59$ y $1,68 \times 10^5$ ufc/ml que corresponde a las muestras recolectadas detrás del mercado municipal de la ciudad de Cumaná. Seguida de la E2, los Dos Ríos, cuyo contaje fue $0,92$ - $1,20 \times 10^5$ ufc/ml, semejante al encontrado en la E3, Las Fraguas, con valores de $0,72$ - $1,08 \times 10^5$ ufc/ml (figura 2). Del total de bacterias heterótrofas aisladas se obtuvo un contaje de colonias similar y homogéneo en las estaciones muestreadas.

Según la norma salvadoreña obligatoria para la calidad de agua para el consumo humano (NSO 13.07.01:97), decretada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “CONACYT”, el valor máximo admisible es de 100 ufc/ml para bacterias heterótrofas, anaerobias y mesófilas.

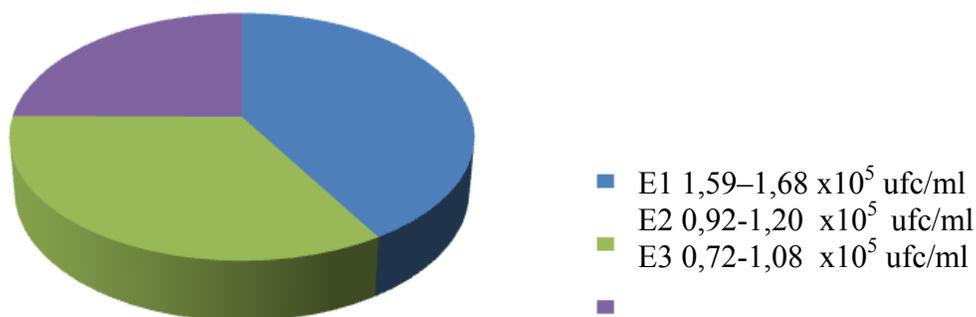


Figura 2. Rangos de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) en las diferentes estaciones de muestreo del río Manzanares, estado Sucre.

Estos resultados, aplicados a la norma Salvadoreña NSO 13.07.01:97, indican que las muestras de agua procedentes de las tres estaciones en estudio, no son aptas para el consumo o contacto humano sin que cause algún daño en la salud, debido a que los contajes obtenidos en las tres estaciones muestreadas fueron cifras superiores a 100 ufc/ml. Esta norma establece que las aguas para consumo deben estar exentas de microorganismos que provoquen enfermedades y de elementos o sustancias que puedan producir efectos fisiológicos perjudiciales.

La distribución y el transporte de agentes patógenos a lo largo de la cuenca del río Manzanares podrían provocar incrementos en las tasas de morbilidad por enfermedades de transmisión hídrica, como han sido reportados por Ferguson *et al.* (2003), quienes estudiaron patrones de dispersión de patógenos en distintas cuencas hidrográficas en Australia. En Venezuela, han sido pocos los estudios realizados a nivel de las cuencas hidrográficas con fines microbiológicos, Barrientos *et al.* (2000), demostraron que existe la presencia permanente de coliformes totales y fecales en los ríos Osorio y Piedra Azul del estado Vargas; de los cuales se distribuye agua para el consumo humano con cargas de coliformes totales que superan el valor establecido en la Norma Venezolana para agua potable envasada COVENIN 1431-82.

Es importante mencionar que en los alrededores de las estaciones muestreadas se llevan a cabo diversas actividades antropogénicas, como en la E1, ubicada entre el mercado municipal y el mercado de pescadores, ambos en la desembocadura del río Manzanares, donde a diario se generan desechos de tipo sólidos y líquidos, producto de la venta de frutas, verduras, hortalizas, aves, carnes y pescados por parte de vendedores, consumidores y población en general. A nivel de su cauce transitan pequeñas embarcaciones pesqueras que constantemente liberan combustibles como gasoil y gasolina comprometiendo cada vez más las aguas del mismo.

Las muestras procedentes de la estación 2 (E2) fueron recolectadas del balneario turístico los Dos Ríos, lugar donde se encuentra un centro poblado alrededor de la

desembocadura del río. La mayoría de los centros poblados ubicados en los márgenes del río depositan sus aguas y desechos domésticos directamente al cauce sin ningún tratamiento previo, de igual manera, los habitantes arrojan sus desechos sólidos a las riberas, incrementando así el deterioro del río.

En la cuenca del río Manzanares son escasas las investigaciones realizadas, para determinar la carga de microorganismos heterotróficos; siendo uno de los últimos el realizado por Fernández (1984), quien reportó que las aguas superficiales de los ríos Manzanares y Guasda (principal tributario del anterior), presentan índices alarmantes de contaminación, especialmente de origen bacteriano; logrando identificar especies patógenas como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y *Vibrio* sp. La situación no parece haber variado desde entonces, ya que siguen drenando a estos ríos las mismas aguas sin tratamiento.

En las Fraguas (E3), el ambiente es diferente, las aguas cristalinas discurren por un lecho pedregoso y boscoso, formando pequeños remolinos y rápidos en su discurrir, en esta zona, el río Manzanares se caracteriza por ser de aguas cristalinas o claras de poca profundidad y con una abundante vegetación, así mismo, las poblaciones son escasas y con pocos habitantes, por lo que la intervención antropogénica por parte de los pocos habitantes está limitada (Benítez, 2004). Sin embargo, se puede evidenciar un contaje total de bacterias heterótrofas de $0,72-1,08 \times 10^5$ ufc/ml, contaje similar al encontrado en el resto de las estaciones en estudio.

Los trabajos realizados anteriormente sobre las aguas del río Manzanares, no revelan la biodiversidad bacteriana presente en las diferentes cuencas del mismo, ya que muestran sólo la cuantificación de coliformes fecales y totales y clostridios, como el realizado por Gutiérrez (2005), que los cuantifica en muestras recolectadas durante los periodos de sequia y lluvia en las cuencas alta y media, en donde se pudieron apreciar valores que van desde $2,3 \times 10^2$ hasta $2,4 \times 10^6$ coliformes totales/100 ml de agua; valores de 0,0 hasta $4,3 \times 10^6$ coliformes fecales/100 ml de agua y de 0,0 a $1,3 \times 10^5$

Clostridium/100 ml, demostrándose la presencia de coliformes fecales, totales y *Clostridium* en todas las estaciones de muestreo evaluadas, con un incremento de los mismos durante el período de lluvia, debido a los movimientos de agua y a la descarga de residuos domésticos sin tratamiento previo.

En la presente investigación se realizó la caracterización de la diversidad de bacterias heterótrofas provenientes de las aguas del río Manzanares, estado Sucre, donde se pudo apreciar la presencia de bacterias aerobias y anaerobias facultativas a nivel de las tres cuencas muestreadas. En la tabla 1, se muestran los grupos bacterianos más predominantes a lo largo de la cuenca del río Manzanares, donde se indica que las bacterias mayormente aisladas fueron aquellas pertenecientes al género *Aeromonas*, con un porcentaje de frecuencia de 29,91%, seguidas de las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus*, en un 24,79%, mientras que el grupo de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF) se aisló de las estaciones de muestreo en un 23,93 % y con respecto a la familia *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella* sp. y *E. cloacae* se encontraron con una frecuencia de 7,69% respectivamente

Tabla 1. Diversidad de bacterias heterótrofas presentes a nivel de las estaciones de muestreo del río Manzanares, estado Sucre.

Microorganismo	Aislados (n)	(%)	Estaciones
<i>Aeromonas</i> sp.	35	29,91	E1, E2, E3
<i>Staphylococcus</i> sp.	29	24,79	E1, E2, E3
BGNF	28	23,93	E1, E2, E3
<i>Shigella</i> sp.	1	0,85	E1
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	7,69	E1, E2, E3
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	0,85	E2
<i>Escherichia coli</i>	5	4,27	E1, E2,
<i>Klebsiella</i> sp.	9	7,69	E1, E2, E3
Total	117	100	

BGNF: Bacilos gramnegativos no fermentadores/ n: número de cepas/E1: mercado municipal/ E2: Los Dos Ríos/ E3: Las Fraguas.

Con respecto al género *Aeromonas*, caracterizados por poseer un metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo (Castro *et al.*, 2002), son patógenos primarios de

anfibios, peces y reptiles, así como también, de animales de sangre caliente: aves, mamíferos acuáticos y terrestres. *A. hydrophila* es la más importante dentro de este género, es el agente etiológico de infecciones sistémicas oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, así como también provoca infecciones en personas que padecen enfermedades hepatobiliares o neoplasias primarias, enfermedades diarreicas en personas sanas e infección de heridas. La gastroenteritis suele ocurrir después de la ingestión de agua o de comida contaminada y la infección de las heridas se observa después de la exposición con agua contaminada (Murray *et al.*, 2002). En el presente estudio, se obtuvo una frecuencia de aislamiento del género *Aeromonas* de 29,91%, este significativo porcentaje pudiera producir cuadros clínicos de enfermedades intestinales y extraintestinales a la población en general, lo que constituye un problema de salud pública.

De igual manera, *Staphylococcus* fue el segundo género mayormente aislado en este estudio con una prevalencia de 24,79%, en donde se encontró un total de 29 cepas en total provenientes de las 3 estaciones muestreadas. *S. aureus* produce comúnmente desde abscesos de piel hasta septicemias mortales y choque tóxico estafilocócico (SSTS); el cual está asociado con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por vómitos, diarrea y fiebre; resultado de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas, producidas por cepas toxigénicas de *S. aureus*, que contaminan y se desarrollan en aguas y alimentos, desencadenando estos síntomas en un período de incubación que va desde 1 a 6 horas (Dinges *et al.*, 2000).

Las bacterias anteriormente descritas fueron los aislados de mayor frecuencia en las tres estaciones muestreadas, esto pudiera representar un grave problema de salud pública, debido al riesgo que enfrenta la población de adquirir dichas enfermedades; a causa de la fácil propagación de estos microorganismos en ambientes acuáticos, por los que drenan sus cauces y los centros poblados que se encuentran en sus inmediaciones.

Dentro del grupo de los BGNF, se encontró una frecuencia de 57,14% de cepas

pertenecientes al género *Pseudomonas*, donde la especie mayormente aislada fue *Pseudomonas aeruginosa* con 39,29%; seguido de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* (17,86%), 7,14% de *Burkholderia* sp. y 17,86% se correspondieron con cultivos de bacilos gramnegativos no fermentadores que no fueron identificados a través de las pruebas bioquímicas convencionales utilizadas en el presente estudio (tabla 2).

Tabla 2. Presencia de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF) en las estaciones de muestreo del río Manzanares, estado Sucre.

Microorganismo	Aislados (n)	Total (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	(39,29%)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	(7,14%)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	(3,57%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	(7,14%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	(17,86%)
<i>Burkholderia</i> sp.	2	(7,14%)
BGNF	5	(17,86%)
Total	28	(100,0%)

BGNF: Bacilos gramnegativos no fermentadores/n: número de cepas.

Las cepas identificadas dentro del género *Pseudomonas*, fueron evaluadas microscópicamente aplicando la coloración de Gram mostrando características típicas: bacilos gramnegativos, pequeños, dispuestos de manera irregular. En el agar LB se observaron colonias translúcidas, brillantes, de consistencia blanda, de bordes estriados y/o alargados; en el agar Mac Conkey se observaron típicas colonias lactosa negativas, algunas de las cuales presentaban pigmento amarillo-verdoso y olor frutal característico.

En la tabla 3, se observan las características bioquímicas de las cepas del género *Pseudomonas* aisladas de las tres estaciones muestreadas del río Manzanares, las cuales mostraron un metabolismo típico en relación a las especies encontradas.

Tabla 3. Características bioquímicas de las cepas del género *Pseudomonas* aisladas de las estaciones muestreadas del río Manzanares, estado Sucre.

Desig	Est.	OXI	MOT	ADH	Lactosa	LDC	O/F GSA	O/F MAL	O/F MAN	O/F SAC	Crec a 42°C	PB 300U	Especies
J 001	E1	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 002	E1	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	S	<i>P. mendocina</i>
J 003	E1	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	S	<i>P. fluorescens</i>
J 004	E1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	S	<i>P. stutzeri</i>
J 009	E1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 014	E1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 015	E2	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 018	E2	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 019	E2	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	S	<i>P. fluorescens</i>
J 020	E2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	S	<i>P. stutzeri</i>
J 225	E3	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 229	E3	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 239	E3	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 242	E3	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 243	E3	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	S	<i>P. aeruginosa</i>
J 244	E3	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	S	<i>P. aeruginosa</i>

Desig.: Designación / Est.: Estación E1: mercado municipal / E2: Los Dos ríos / E3: Las Fraguas / OXI: Oxidasa / MOT: Motilidad / ADH: Arginina D-hidrolasa / LDC: Lisina descarboxilasa / OF GSA / OF MAL / OF MAN / OF SAC: Oxidación-fermentación Glucosa / Maltosa / Manitol / Sacarosa / Crec.: Crecimiento/ S: Sensible/ PB: Polimixina B.

En la tabla 4 se muestra la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *P. aeruginosa* del río Manzanares frente a los antibióticos probados.

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del río Manzanares.

Antibióticos	n	Sensibilidad (%)
IMP	11	100,00
GM	11	100,00
AN	11	100,00
CIP	11	100,00
CAZ	10	91,90
TIC	11	0,00

IMP: Imipenem / GM: Gentamicina / AN: Amikacina / CIP: Ciprofloxacina / CAZ: Ceftazidima/ TIC: Ticarcilina/ n: número de cepas.

El 100% de los aislados de *P. aeruginosa* resultó sensible a ciprofloxacina, imipenem, gentamicina y amikacina, solo una cepa resultó resistente a ceftazidima y resistentes a ticarcilina (tabla 4). *P. aeruginosa in vivo* muestra resistencia a este antibiótico inclusive en combinación con ácido clavulánico, debido a la presencia de una betalactamasa plasmídica en *P. aeruginosa* denominada PSE (*Pseudomonas specific enzyme*) que se caracteriza por hidrolizar ticarcilina y piperacilina (Livermore, 1995; Poole, 2001).

La cepa de *P. mendocina* resultó sensible a todos los antibióticos probados; mientras que los dos aislados de *P. fluorescens* fueron sensibles a los antibióticos, mostrando resistencia sólo a ciprofloxacina, y las dos cepas de *P. stutzeri* fueron sensibles a los antibióticos probados a excepción de ceftazidima y ticarcilina.

La resistencia por parte de estas cepas a los betalactámicos puede ser consecuencia de la producción de enzimas β -lactamasas, característico de las bacterias de este género, ya que esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar el anillo betalactámico de las penicilinas y cefalosporinas (Livermore, 2002).

El grado de sensibilidad encontrado puede ser debido a que son cepas de origen ambiental, dicho hábitat no ha sido sometido frecuentemente a sustancias antimicrobianas, lo necesario como para desarrollar en ellas mecanismos de resistencia, ya que cepas salvajes de *P. aeruginosa* son sensibles a los aminoglucósidos y carbapenemes. La resistencia a estos antibióticos en *P. aeruginosa* es siempre del tipo adquirida, la cual puede surgir como resultado de una presión selectiva en el entorno en el cual la bacteria se desarrolla (Vila y Marco, 2002).

Estos resultados difieren a los encontrados por Lösch *et al.* (2005), quienes reportan que el 100% de los aislados de *P. aeruginosa* provenientes de fuentes de aguas superficiales de la provincia de Chaco (Argentina) fueron sensibles a ceftazidima y ciprofloxacina; sin embargo, el 12,10% fue resistente a gentamicina y sólo el 0,93% de las cepas resultó resistente a imipenem.

Aquellas cepas que mostraron resistencia por difusión en discos, se les realizó la CMI. Los aislados de *P. stutzeri* que presentaron resistencia por el método de difusión en agar para ceftazidima fueron inhibidos con una concentración de 4 µg/ml a diferencia de las cepas de *P. aeruginosa* que requirió una mayor concentración de antibiótico igual a 8 µg/ml de ceftazidima para inhibir el crecimiento de la misma. En el caso de *P. fluorescens* las cuales presentaron resistencia a ciprofloxacina, requirieron de 0,5 µg/ml de ciprofloxacina para inhibir su crecimiento. La CIM para las cepas resistentes a ticarcilina no pudo ser medida, debido a que no se encontró el compuesto comercialmente.

Se demostró que la susceptibilidad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria de las cepas provenientes de las aguas del río Manzanares, en general, son sensibles a los antibióticos probados. Al respecto, Ruíz (2007), sostiene que las cepas de tipo ambiental por encontrarse en la naturaleza, donde la presión selectiva ejercida

por los antibióticos es menor o casi nula en relación a las cepas intrahospitalarias; debido a la escasa exposición a los antimicrobianos, es común encontrar una baja frecuencia en los mecanismos que dan lugar a las resistencias bacterianas.

En la Tabla 5 se muestran las medidas en milímetros de los halos de inhibición, como resultado del efecto antagónico entre las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas de las diferentes estaciones de muestreo del río Manzanares y las cepas indicadoras provenientes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos CVCM.

Tabla 5. Efecto antagónico producido por las sustancias extracelulares de *Pseudomonas* spp. provenientes de muestras de agua del río Manzanares, estado Sucre frente a cepas del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM).

Desig.	Especie	Medidas de los halos de inhibición (mm)			
		<i>P. aeruginosa</i> CVCM 787	<i>E. coli</i> K12 CVCM 178	<i>B. subtilis</i> CVCM 591	<i>S. aureus</i> CVCM 636
J 001	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	12
J 002	<i>P. mendocina</i>	0	0	0	0
J 003	<i>P. fluorescens</i>	0	0	0	0
J 004	<i>P. stutzeri</i>	14	0	14	0
J 009	<i>P. aeruginosa</i>	12	0	9	11
J 014	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
J 015	<i>P. aeruginosa</i>	22	22	22	25
J 018	<i>P. aeruginosa</i>	11	0	9	0
J 019	<i>P. fluorescens</i>	0	0	14	0
J 020	<i>P. stutzeri</i>	0	0	0	0
J 225	<i>P. aeruginosa</i>	15	19	27	29
J 229	<i>P. aeruginosa</i>	12	27	26	29
J 239	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
J 242	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
J 243	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	28
J 244	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	19

Se observó que de las dieciséis (16) cepas en estudio, diez (10) produjeron sustancias antagónicas contra las especies indicadoras del CVCM. Tres (3) de las cepas del género *Pseudomonas* aisladas de la cuenca del río Manzanares (J015, J225 y J229; identificadas como *P. aeruginosa*), produjeron sustancias extracelulares antagónicas simultáneamente contra las cuatro (4) especies indicadoras (*P. aeruginosa* CVCM 787, *E. coli* K12 CVCM 178, *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 636). Siete (7) cepas (J001, J009, J015, J225, J229, J243, y J244) lograron inhibir el crecimiento de *S. aureus* CVCM 636, del mismo modo *B. subtilis* CVCM 591, fue inhibido por otros siete (7) aislados (J004, J009, J015, J018, J019, J225 y J229). *E. coli* K12 CVCM 178, fue la menos afectada en la inhibición de su crecimiento, debido a que, sólo tres (3) de los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* (J015, J225 y J229) pudieron inhibirla; mientras que el crecimiento de *P. aeruginosa* CVCM 787 fue inhibido por seis (6) de los aislados del río del género *Pseudomonas* (J004, J009, J015, J018, J225 y J229). En dicha tabla también se puede observar que los halos de inhibición de mayor tamaño fueron producidos contra *S. aureus* CVCM 636 y *B. subtilis* CVCM 591.

Esto se traduce en una excelente capacidad, por parte de estas bacterias, de producir sustancias antagónicas que inhiben el crecimiento de cepas relacionadas, así como también de cepas pertenecientes a géneros diferentes (Cain *et al.*, 2003).

Morales (2009), observó actividad antagónica en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de coprocultivos de niños menores de 5 años en el estado Sucre, en donde 3 cepas produjeron efecto antagónico contra *P. aeruginosa* CVCM 787, dos contra *E. coli* K12 CVCM 131, una sola cepa inhibió a *B. subtilis* CVCM 591, mientras que ningún aislado inhibió a *S. aureus* CVCM 636.

Las bacteriocinas actúan como antagonistas que impiden o limitan la invasión de una cepa sensible dentro de una comunidad microbiana, a través de la lisis

enriqueciendo de nutrientes al medio ambiente local, cuando estos son limitados y se encuentra en riesgo su supervivencia (Kim, 1997). Los mecanismos de acción o competencia entre estos microorganismos son diversos, incluyendo producción de sustancias tipo antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, lisosomas, proteasas e incluso la alteración de pH a través de la producción de ácidos orgánicos (Hamdan *et al.*, 1991; Frey *et al.*, 1996).

Tabla 6. Efecto antagónico producido por las sustancias extracelulares de *Pseudomonas* spp. provenientes de muestras de agua del río Manzanares, estado Sucre, frente a cepas bacterianas aisladas de este mismo ambiente.

Desig.	Especies	Medidas de los halos de inhibición (mm)			
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>S. aureus</i>
J 001	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
J 002	<i>P. mendocina</i>	0	0	0	0
J 003	<i>P. fluorescens</i>	0	0	0	0
J 004	<i>P. stutzeri</i>	0	0	0	0
J 009	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
J 014	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
J 015	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	15
J 018	<i>P. aeruginosa</i>	29	25	0	0
J 019	<i>P. fluorescens</i>	0	0	0	0
J 020	<i>P. stutzeri</i>	0	0	37	0
J 225	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	40	22
J 229	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	33	26
J 239	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	30	26
J 242	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	32	18
J 243	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	35	0
J 244	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	41	0

Los resultados de antagonismos presentados en la tabla 6, muestran que del total de dieciséis (16) cepas del género *Pseudomonas* aisladas de la cuenca del río Manzanares, nueve (9) produjeron sustancias inhibitorias contra cepas provenientes de su mismo medio acuático. Además se refleja, que la cepa más sensible fue *A. hydrophila* la cual fue inhibida por siete (7) aislados de *Pseudomonas* (J020, J225,

J229, J239, J242, J243, J244), dicha inhibición fue la más notoria produciendo halos que van de 30 a 41 mm. La segunda especie mayormente afectada fue *S. aureus*, que fue inhibida por cinco (5) cepas (J015, J225, J229, J239 y J242); mientras que *P. aeruginosa* y *E. cloacae* sólo fueron inhibidos por una sola cepa productora (J018).

Según Nikaido y Hancock (1986), *Pseudomonas* además de producir sus propias sustancias antimicrobianas, ha desarrollado y mantenido la habilidad intrínseca de resistir los compuestos secretados por otros microorganismos. Se ha demostrado que *P. aeruginosa* presenta una baja permeabilidad en su membrana externa, determinada por las propiedades de sus porinas, lo cual, probablemente, surge de la competición por un nicho ecológico, como el agua y el suelo, donde muchos microorganismos producen sustancias tipo antibiótico como bacteriocinas y pigmentos (Cain *et al.*, 2003).

Diversos autores han demostrado la presencia de sustancias antibacterianas por parte del género *Pseudomonas*, Padilla *et al.* (2002), encontraron un péptido de 2 600 M_r, aislado y purificado a partir de *Pseudomonas* sp. denominado Ps VP-10 que posee actividad letal sobre *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*; Pseudocin, es otra de las sustancias inhibitorias producidas por *Pseudomonas*, la cual tiene una acción letal sobre *E. aerogenes*, *C. freundii* y *Klebsiella* sp. (Marchand, 2006).

Esto resulta de gran interés si se trata de emplear dichas sustancias inhibitorias producidas por estas bacterias como estrategia de biocontrol a futuro, con lo cual se podrían disminuir los índices de patógenos entéricos y oportunistas contribuyendo al saneamiento de este y otros ríos.

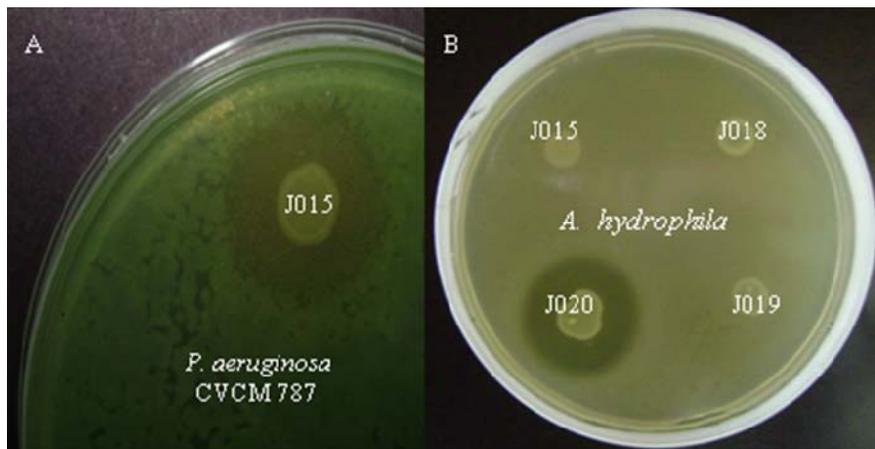


Figura 3. Efecto antagonístico de sustancias extracelulares producidas por aislados del género *Pseudomonas* provenientes del río Manzanares, estado Sucre. A: Bacteriocina producida por *P. aeruginosa* (J015) proveniente del río Manzanares frente a *P. aeruginosa* CVCM 787. B: Comparación entre un antagonismo positivo (presencia de halo) por parte de *P. stutzeri* (J020) y negativo (ausencia de halo) frente a *A. hydrophala* proveniente del río Manzanares.

La actividad inhibitoria, como resultado del antagonismo de sustancias extracelulares de los aislados del género *Pseudomonas* contra las cepas indicadoras, así como frente a las especies mayormente aisladas de las aguas del Manzanares, varió desde simples halos de inhibición de 9 mm hasta potentes antagonismos bacterianos de 41 mm de diámetro, cuyos resultados fueron reproducibles independiente de las réplicas analizadas.

De dieciséis (16) cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas del río Manzanares, trece (13) en total resultaron ser productoras de sustancias extracelulares antagonicas contra cepas del CVCM, así como también, contra varias especies aisladas de este cuerpo de agua. Al relacionar el efecto antagonístico de los aislados del río Manzanares con su perfil de susceptibilidad, a través de la prueba de Chi cuadrado, se obtuvo que todas ellas presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), con un 95% de confianza, estos datos permiten inducir que las cepas producen sustancias antagonicas como mecanismo para permanecer en este ambiente y al ser tan sensibles favorece su empleo como biocontrol para contrarrestar el daño que causan patógenos entéricos y oportunistas en este río y diversos ambientes impactados (tabla 7).

Tabla 7. Relación del efecto antagónico con el perfil de susceptibilidad de las especies de *Pseudomonas* aisladas del río Manzanares.

Desig.	Especie	Nº de cepas inhibidas	CAZ	CIP	Valor P
J 001	<i>P. aeruginosa</i>	1	R	S	1,19 x10 ⁻⁰⁶
J 004	<i>P. stutzeri</i>	2	R	S	5,41 x10 ⁻¹¹
J 009	<i>P. aeruginosa</i>	3	S	S	0,026
J 015	<i>P. aeruginosa</i>	5	S	S	4,52 x10 ⁻⁰⁶
J018	<i>P. aeruginosa</i>	4	S	S	4,52 x10 ⁻⁰⁶
J 019	<i>P. fluorescens</i>	1	S	R	0,0018
J 020	<i>P. stutzeri</i>	1	R	S	1,99 x10 ⁻¹¹
J 225	<i>P. aeruginosa</i>	6	S	S	1,12 x10 ⁻⁰⁸
J 229	<i>P. aeruginosa</i>	6	S	S	1,12 x10 ⁻⁰⁸
J 239	<i>P. aeruginosa</i>	2	S	S	0,0018
J242	<i>P. aeruginosa</i>	2	S	S	0,0018
J 243	<i>P. aeruginosa</i>	2	S	S	0,0018
J 244	<i>P. aeruginosa</i>	2	S	S	0,0018

P<0,05* Diferencias significativas, P<0,01** Muy significativas, P<0,001*** Altamente significativas.

CONCLUSIONES

Se aislaron diversos géneros bacterianos del río Manzanares, estado Sucre; donde el microorganismo de mayor frecuencia fue *Aeromonas* sp., respecto al grupo de bacilos gramnegativos no fermentadores, el aislado de mayor frecuencia fue *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas del río Manzanares presentan en su mayoría sensibilidad a los antibióticos probados.

Las sustancias extracelulares inhibitorias producidas por las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de la cuenca del río Manzanares resultaron ser más efectivas contra *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus*.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios microbiológicos periódicamente en las aguas del río Manzanares, destinados no sólo a la determinación de Coliformes totales y fecales, sino también a contajes de bacterias heterótrofas totales; debido a que no sólo los coliformes causan enfermedades hídricas.

Debido a que el río Manzanares es el cuerpo de agua dulce de mayor envergadura para el estado Sucre y sus inmediaciones, es importante desarrollar medidas de saneamiento y biocontrol en su cauce.

Determinar la naturaleza química de las sustancias antagónicas y medir su efecto inhibitorio sobre diferentes microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, G.; Vilchez, G. y Rodríguez, V. 2000. How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. *Inter. Microbiol.*, 3: 81-88.

Arquéz, J. 2003. “Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos”. “Productos lácteos”. <<http://www.ucm.es/bucm/tesis/vet/ucm>> (03/09/2006).

Barrientos, Y.; González, D. y Urbani, F. 2000. Estudio Hidroquímico de los manantiales Cumbotico y Cumbote. Colonia Tovar. Estado Aragua. *Ecotrópicos*, 13(2): 81-89.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standard sized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496.

Becerra, C. 1993. Infecciones nosocomiales. Perfil epidemiológico. *Actualización en infectología*, 1: 25-27.

Benítez, S. 2004. Determinación de la carga orgánica impuesta al río Manzanares en el periodo Febrero-Junio. Trabajo Final de Grado. Departamento de Química, Mención Química Aplicada. Instituto Universitario de Tecnología, Cumaná.

Cain, C.; Lee, D.; Waldo, R.; Henry, A.; Casida, E.; Wani, M.; Wall, C.; Oberlies, M. y Falkinham, N. 2003. Synergistic antimicrobial activity of metabolites produced by a nonobligate bacterial predator. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(7): 2213-2117.

Castillo, E. 2000. Identificación de Bacilos Gram negativos no Fermentadores de la Glucosa. Manual del Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo.

Castro, E.; Aguilera, A.; Giono, C.; Hernández, C.; Rodríguez, Ch. y Soler, L. 2002. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enf. Infect. Microbiol.*, 22: 206-216.

CENDES. 1987. *Atlas de la zona protectora del macizo montañoso del Turimiquire. Decenio del Agua*. Universidad Central de Venezuela.

Clinical Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, approved standard- nine edition. Document., M2-A8, 23(1).

Cintas, L.; Casaus, M.; Herranz, C.; Nes, I. y Hernández, P. 2001. REVIEW: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Scienc. Technol. Inter.*, 7(4): 281-305.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1982. El agua potable envasada: requisitos. 1431. Caracas: Fondo Norma.

Dinges, M.; Orwin, P. y Schlievert, P. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 16-34.

Dopazo, M.; Lemos J.; Barja, J. y Toranzo, A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 97-101.

Esnard, S. y Díaz, O. 1997. Identificación y caracterización de bacilos Gram negativos no fermentadores en el medio hospitalario. *Rev. Cub. Hig. y Epidemiol.*, 35: 30-37.

Fenical, W. y Jensen P. 1993. Marine Microorganisms: A new biomedical resource. In: *Marine Biotechnology. Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. Attaway, D. y Zaborsky, O. (eds.). New York. Págs. 419-455.

Ferguson, C.; Husman, A.; Altavilla, N.; Deere, D. y Ashbolt, N. 2003. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Crit. Rev. Environ. Sc. Technol.*, 33: 299-361.

Fernández, E. 1984. Contaminación de los ríos Guasdua y Manzanares, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Int. Oceaogr. Ven. Univ. Oriente*, 23(1): 113-128.

Fredrickson, A. y Stephanopoulos, G. 1981. Microbial competition. *Science*, 213: 272-278.

Frey, P.; Smith, J.; Albar, L.; Prior, P.; Saddler, G.; Trigalet, D. y Trigalet, A. 1996. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race of French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 473-479.

García, H. 1992. Mecanismos de la actividad antibiótica de las bacteriocinas. *Rev. Med. Chil.*, 120: 439-444.

Godoy, G. 1991. Estudio espacio-temporal de los parámetros fisicoquímicos en la zona estuarina del río Manzanares (Cumaná- Venezuela). Trabajo de Postgrado M.Sc. Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná.

Grande, M.; Lucas, R.; Abriouel, H.; Ben-Omar, N.; Maqueda, M.; Martínez, B.; Martínez, C.; Valdivia, E. y Galvez, M. 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Inter. J. Food Microbiol.*, 104: 289-297.

Gutierrez, A. 2005. Evaluación fisicoquímica y microbiológica de las aguas superficiales de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, durante el periodo mayo 2002- junio 2003. Trabajo de Postgrado M.Sc. Ciencias Marinas, Mención Oceanografía Química. Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná.

Hamdan, H.; Weller, D. y Thomashow, L. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3270-3277.

Hardalo, C. y Edberg, S. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.*, 23: 47-75.

Hechard, T. y Sahl, H. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84: 545-557.

Instituto Nacional de Estadísticas, I.N.E - Censo 2001.

Jack, R. y Jung, G. 2000. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 310-317.

Johsen, A.; Winding, A.; Karlson, U. y Roslev, P. 2002. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of C¹³-labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 6106-6113.

Jones, A.; Dodd, M.; Doherty, C.; Govan, J. y Webb, A. 2002. Increased treatment requirements of patients with cystic fibrosis who harbour highly transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax*, 57: 924-935.

Kado, C. 1998. Origen and evolution of plasmid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 117-126.

Kim, W. 1997. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25: 169-171.

Koneman, E.; Stephen, A.; Janda, W.; Schreckemberger, P. y Washington, W. 2004. *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Bogotá.

Koneman, E.; Stephen, A.; Janda, W.; Schreckemberger, P. y Washington, W. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Bogotá.

León, J.; Tapia, G. y Avalos, R. 2005. Purificación parcial y caracterización de una sustancia antimicrobiana producida por *Alteromonas* sp. de origen marino. *Rev. Per. Biol.*, 1: 1727-9933.

Lakey, J. y Slatin, S. 2001. Pore-forming colicins and their relatives. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 257: 131-161.

Lemos, M.; Toranzo, A. y Barja, J. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweed. *Microbiol. Ecology*, 11: 149-163.

Livermore, D. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557-84.

Livermore, D. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 634-640.

Lodeiros, C.; Espín, A.; Ordaz, Y. y González, C. 1989. Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas de humanos. *Acta Científica Venezolana. Microbiología*, 40: 610-617.

Long, R. y Azam, F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4975-4983.

Lösch, L.; Merino, L. y Alonso, J. 2005. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia de Chaco (Argentina). Comunicaciones científicas y tecnológicas. Campus Resistencia. Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. M-014.

Mackay, C.; Arendse, V. y Hastings, J. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.*, 34: 1-16.

Madigan, M. y Martinko J. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. Eleventh edition. Edition Prentice Hall.

Marchand, E. 2006. "Microorganismos indicadores de agua de consume humano en Lima metropolitana". "Sisbib". <<http://sisbib.unmsn.edu.pe7bibvirtual/tesis>> (25/01/08)

Márquez, A.; Senior, W. y Martínez, G. 2000. Concentraciones y comportamiento de metales pesados en una zona estuarina de Venezuela. *Interciencia*, 25(6): 284-291.

Márquez, A.; Senior, W. y Castañeda, J. 2002. Environmental conditions of the waters of the Manzanares river, Cumaná- Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 41(1): 15-24.

Michel-Briand, Y. y Baysse C. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84: 593-604.

Milne, D. 1989. Share base microbiological sampling of recreational bathing water. Possible problem and solutions. *Wat. Shed.*, 11: 331-333.

Morales, Y. 2009. Actividad antagónica de *P. aeruginosa* provenientes de coprocultivos de niños de 5 años, Cumana, estado Sucre. Tesis de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Murray, P.; Rosenthal, K.; Kobayashy, G. y Pfaller, M. 2002. *Microbiología Médica*. Cuarta edición. Elsevier Science Mosby. Madrid.

Narváez, P.; Pedroza, R.; Alonso, G. y Rodríguez, V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 25: 29-34.

Nikaido, H. y Hancock, R. 1986. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosas*. In: *The bacteria: A treatise on structure and function*. Sokatch, J. (ed.). Págs. 143-193.

Norma Salvadoreña Obligatoria para la Calidad del Agua Potable. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)". 1997. <<http://www.puntofocal.gov.ar>> (10/11/09).

Ochoa, 1971. Contaminación del río Manzanares y laguna de oxidación Central Cumanacoa, *Informe N° 55 del Servicio de Hidrología y Riego*, I.F.P.A. Barquisimeto.

Padilla, C.; Lobos, O.; Brevis, P. y Abaca, P. 2002. Efectos de bacteriocin Ps VP-10 producidos por *Pseudomonas* sp. sobre especies bacterianas sensibles. *Rev. Latinoam Microbiol.*, 44(1): 19-23.

Palleroni, N. 2005. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J. y Garrity, G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Springer, J. (ed.). New York. Págs. 323-379.

Pitt, T. y Gaston, M. 1995. Bacteriocin typing. *Methods Mol. Biol.*, 46: 5-14.

Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 255-264.

Ress, G. 1993. Health implications of sea water in coastal water the British case. *Mar. Poll. Bull.*, 26(1): 14-19.

Riley, M. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 32: 255-278.

Riley, M. y Wertz, J. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 117-137.

Rockne, K.; Chee-Sanford, J.; Sanford, R.; Brian, P.; James, T. y Staleyand, S. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4): 1595-1601.

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

Ruíz, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis doctoral. Facultad de medicina, Universidad de Barcelona.

Sablon, E.; Contreras, B. y Vandamme, E. 2000. *Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria*: Mode of action, genetic and biosynthesis. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer, J. (ed.). New York. Págs. 689-697.

Senior, W. y Godoy, G. 1990. Estudio fisicoquímico del río Manzanares, Cumaná, Venezuela. *Bot. Inst. Oecoaogr. Univ. Oriente*, 29(1): 160-172.

Smith, M. y Vidaver, A. 1982. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW-1 in plant tissue. *Can. J. Microbiol.*, 28: 600-604.

Sokal, R. y Rolf, F. 1981. *Introducción a la bioestadística*. Ed. Reverte S.A. España.

Stierle, A.; Cardellina, J. y Singleton, F. 1988. A marine *Micrococcus* produced metabolites ascribed to sponge *Tedanis ignis*. *Experientia*, 44: 1021.

Taylor, P. 1993. The estate of the marine environment: a critique of the work and role of the joint group of experts on scientific aspect of marine pollution (GESAMP). *Mar. Poll. Bull.*, 26(3): 120-127.

Torres, D. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Rev. Ecosistemas*, 12(2): 169-240.

Vasquez, M. y Reyes, W. 2002. Degradación de aroclor 1242 por *Pseudomonas* sp. *Biblioteca nacional del Perú*. Perú.

Vila, J. y Marco, F. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, 20(6): 304-12.

Wollum, A. 1994. Soil sampling for microbiological analysis. In: *Methods of soil analysis*. Part 2. Microbiological and biochemical properties. Weaver, R.; Angle, S.; Bottomley, P.; Bezdick, D.; Smith, S.; Tabatabai, A. y Wollum, A. (eds.). Book series no. 5. Soil Science Society of America. Madison. Págs. 1-14.

HOJA DE METADATOS

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

Título	Antagonismo de sustancias extracelulares de aislados de <i>Pseudomonas</i> sp. provenientes de la Cuenca del Río Manzanares Cumaná, Estado Sucre.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Barrios C., Jenire J.	CVLAC	16996037
	e-mail	jenirebach11@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Antagonismo, <i>Pseudomonas</i>, Río Manzanares.

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En el presente estudio se evaluaron muestras de agua a nivel de tres estaciones, las Fraguas, los Dos Ríos y detrás del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná, cuyo propósito fue caracterizar la presencia de sustancias extracelulares en aislados de *Pseudomonas* sp., provenientes de la cuenca del río Manzanares. La identificación bacteriana se realizó a través de pruebas bioquímicas convencionales. La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en agar, recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) empleando: imipenem (IPM), gentamicina (GM), amikacina (AMK), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP) y ticarcilina (TIC). Para caracterizar la presencia de sustancias extracelulares del género *Pseudomonas* se empleó la técnica de doble capa. Se encontró un total de 16 cepas perteneciente al género *Pseudomonas*, 29 a *Staphylococcus*, 25 a enterobacterias y 35 del género *Aeromonas*. Los aislados de *P. aeruginosa* fueron resistentes a TIC y una sola cepa a CAZ; *P. fluorescens* mostró resistencia a CIP; mientras que, *P. stutzeri* resultó resistente a CAZ y TIC. Del total de aislados pertenecientes al género *Pseudomonas*, siete (7) produjeron sustancias extracelulares antagónicas que inhibieron a *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 636; seis (6) inhibieron a *P. aeruginosa* CVCM 787 y tres (3) lograron inhibir a *E. coli* K12 CVCM 178. Al enfrentar *Pseudomonas* sp. provenientes del río contra las cepas aisladas de este mismo medio acuático, se obtuvo que siete (7) cepas lograron inhibir a *A. hydrophila*, cinco (5) cepas inhibieron a *S. aureus* y una (1) cepa inhibió a *E. cloacae* y *P. aeruginosa*. Las cepas de *Pseudomonas* aisladas del río Manzanares produjeron sustancias extracelulares antagónicas, las cuales pudieran emplearse como estrategia de control biológico de la densidad bacteriana en este tipo de ambientes, debido a su capacidad de inhibir especies patógenas aisladas del mismo.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Yasmina Araque	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	yamasi40@hotmail.com
	e-mail	
Sara Centeno	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Luzmila Albarado	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	luzalv@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	01	29

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_JJBC.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial : Universal

Temporal: Intemporal

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

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:

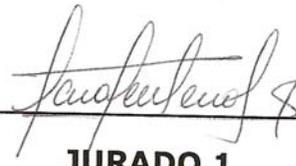
Para publicar título y resumen únicamente en la página web.



AUTOR 1
Jenire Barrios



TUTOR
Yasmina Araque



JURADO 1
Sara Centeno



JURADO 2
Luzmila Albarado

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS: