



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

AISLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS
 EN LA CUENCA DEL RÍO MANZANARES, CUMANÁ, ESTADO SUCRE
 (Modalidad: Investigación)

MARIELYS YSABEL GONZÁLEZ MILLÁN

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

Cumaná, febrero de 2010

AISLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS
EN LA CUENCA DEL RÍO MANZANARES, CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

Profa. Yasmina Araque C.
Asesora Académica

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Descripción del área de estudio.....	7
Muestra.....	7
Recolección y transporte de las muestras.....	8
Siembra	8
Identificación bioquímica	9
Fermentación de azúcares	9
Oxidasa.....	9
Motilidad.....	9
Oxidación de Azúcares	10
Descarboxilación de la lisina	10
Hidrólisis de la arginina	10
Crecimiento a 42°C	11
Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de biopelículas a través del método del agar rojo congo:	11
Determinación de la adherencia y formación de biopelículas a través del método de Safranina en tubo o macrométodo en tubo.....	11
Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos	12
Análisis de datos	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27
HOJA DE METADATOS	33

DEDICATORIA

A:

Dios, porque ha sido mi compañero durante todo este camino y por estar siempre presente en todas las cosas que emprendo en mi vida.

Mis padres: Roselis Millán y Rafael González por todo el esfuerzo que han hecho para cumplir esta meta tan importante en mi vida.

Mis hermanas: María Laura y Virginia, que les sirva de ejemplo para lograr sus metas profesionales.

Mi abuela, Aracelis Millán por su apoyo incondicional y confianza.

AGRADECIMIENTOS

A:

La Prof. Yasmina Araque, por su asesoramiento y apoyo en la elaboración de mi tesis.

La Prof. Dina Antón, por su valiosa orientación y buenos consejos durante el desarrollo de la parte experimental de mi trabajo de grado.

La Prof. Elsa Salazar por la ayuda prestada en el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Bioanálisis, para la culminación de la parte experimental de este trabajo.

Mis tíos Paulo Hecker y Carmen Millán por brindarme todo su apoyo en este largo camino y por hacerme sentir como en casa.

Mis amigos: Rita Loero, Karol Bottaro, María Antonieta Hernández, Carmen Carpio, Saray Ortíz, Dairene Moreno, Candy Patiño, Adriana Rojas y Jesús Rodríguez, por estar siempre presentes en los momentos importantes de mi vida y brindarme su cariño.

A todos mil gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre.	14
Tabla 2. Porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre.....	16
Tabla 3. Patrones fenotípicos de susceptibilidad en aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre.....	18
Tabla 4. Relación de la formación de biopelículas con el perfil de susceptibilidad de las especies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cuencas hidrográficas del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre.	7
Figura 2. Perfil bioquímico de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes del río Manzanares de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	15
Figura 3. Producción de exopolisacárido determinadas a través del método del agar rojo congo en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre. Morfología típica de las colonias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por el método del agar rojo congo. A): Colonias rosadas (no formadoras de biopelículas), B): Colonias blancas (formadoras de biopelículas).....	19
Figura 4. Producción de exopolisacárido determinadas a través del método de la safranina en tubo en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre. A): bacteria no formadora de biopelículas, B): bacteria formadora de biopelículas.	22

RESUMEN

Se determinó la producción de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares de la Ciudad de Cumaná, estado Sucre. La identificación de las cepas se llevó a cabo por métodos bioquímicos convencionales empleados para bacilos gramnegativos no fermentadores. La producción de biopelículas se estudió a través del método del rojo congo y por el método clásico de safranina en tubo. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión en disco (CLSI 2007). En el presente estudio se identificaron 16 cepas (88,89%) de *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales forman parte del ecosistema del río Manzanares. Las cepas mostraron bajos porcentajes de resistencia a la ciprofloxacina (6,25%), imipenem (12,50%), Piperacilina (18,75%), meropenem (18,75%) y piperacilina/tazobactam (18,75); estas solo mostraron elevados porcentajes de resistencia a la tobramicina (37,50%), gentamicina (43,75%) y aztreonam (56,25%). Se obtuvieron 7 fenotipos diferentes a través de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 87,50% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron capaces de formar biopelículas y solo 2 cepas (12,50%) no presentaron esta propiedad, obteniéndose los mismos resultados tanto por el método del rojo congo como por el método clásico de la safranina en tubo. Al relacionar los perfiles de resistencia con la producción de exopolisacárido se evidenció que tanto las cepas resistentes como sensibles pueden formar biopelículas. Estas cepas presentaron altos porcentajes de sensibilidad a los antibióticos, esto puede deberse a la procedencia de estas, ya que son de origen ambiental y fueron capaces de formar biopelículas para adaptarse y sobrevivir a un determinado ambiente.

Palabra y/o Frases Claves: *Pseudomonas aeruginosa*, Biopelículas, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* P001, Matriz exopolisacárida, Biorremediación.

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas (del inglés biofilm) son comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijos a una superficie, formadas por una única especie o una variedad de especies diferentes (Costerton, 1995). Se pueden encontrar biopelículas en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, debido a que pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas (Miller y Ahearn, 1987). Las biopelículas poseen múltiples características, que las convierte en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen; una de estas características es la heterogenicidad, lo que las hace organizaciones únicas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos. Se ha visto que los microorganismos al ser variados dentro de esta organización presentan diferentes microambientes, pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno (Costerton *et al.*, 1994; Vroom *et al.*, 1999).

El estudio sobre la naturaleza de las biopelículas se inició tiempo atrás, cuando A. Van Leeuwenhoek, en el siglo XVII, utilizando sus microscopios de luz simples, fue el primero en describir, la presencia de microorganismos adheridos a superficies dentales (Dolan, 2002), a raíz de lo cual se le reconoce como el descubridor de las biopelículas bacterianas. Sin embargo no fue hasta 1978 cuando Costerton y colaboradores, describieron la presencia de comunidades bacterianas embebidas en matriz glucoproteica unidas a superficies en contacto con el agua (Nazar, 2007) Dos décadas después con el desarrollo de técnicas de microscopia más avanzada permitieron entender la ultraestructura y dinámica de estas asociaciones (Maestre y Maestre, 2004).

La formación de biopelículas no es un proceso aleatorio, sigue una sistemática que permite su predicción. Se han identificado cinco etapas: Adhesión inicial del microorganismo a la superficie, colonización, crecimiento, maduración y desarrollo final de la colonia con dispersión de las células colonizadoras (Costerton, 1995).

El proceso de formación de las biopelículas, también va a depender de la influencia de factores ambientales como: temperatura, pH, velocidad de flujo, así como de factores genéticos que codifican funciones motrices, de la sensibilidad ambiental, adhesinas y otras proteínas (Costerton, 1995; O' Toole, 2000; Kraigsley *et al.*, 2002). Una vez que la célula individual se une a una superficie, esta empieza a crecer y a esparcirse sobre la superficie en una monocapa, formando microcolonias y produciendo uno de los cambios más evidentes e importantes para formar el "Biofilm maduro" que es la matriz exopolisacárida, cuya concentración es poco conocida, pero consta de polisacáridos o glicoproteínas, de diversos azúcares como glucosa, fructosa, manosa, N – acetilglucosamida y otros. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos o teicoicos (Chmielewski, 2003; Danese *et al.*, 2000).

La matriz exopolisacárida o glicocálix producida en estas biopelículas es excretada por la pared celular bacteriana y es responsable, junto al anclaje de los apéndices bacterianos (pilis, fimbrias, adhesinas), de la unión irreversible de las biopelículas, y también actúan como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar nutrientes, lo que beneficia a las células primitivas para que se desarrollen con menos limitaciones y para que las células hijas produzcan su propio glicocálix, dando lugar a una próspera colonia bacteriana (Marshall, 1992).

En las biopelículas maduras, la mayor parte de su volumen está ocupado por la matriz laxamente organizada (75-95%) alrededor de unas pocas bacterias (5-25%), que proporciona una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua disponible. Los estudios que han permitido descubrir esta estructura han sido realizados en aguas residuales, ya que este tipo de ambiente acuoso es rico en nutrientes y le proporciona las condiciones necesarias para que se originen las biopelículas (Chmielewski, 2003).

Para adaptarse a la vida de las biopelículas, una bacteria ha de sufrir cambios radicales, ya que este medio activa diferentes genes que codifican nuevas proteínas

estructurales y enzimas (Davey y O'Toole, 2000). Estos genes y proteínas son los que explican la fijación y resistencia de las bacterias incluidas en las biopelículas ante los antibióticos o desinfectantes. A partir del año 2000, los avances en la proteómica y genómica han permitido avanzar en el estudio de sistemas complejos como las biopelículas; se han podido identificar 800 proteínas que cambian de concentración a lo largo de las cinco fases de desarrollo (Whiteley, 2001; Singh, 2002). También se ha podido demostrar la síntesis en pocas cantidades de enzimas hidrolíticas de tipo β -lactamasa, que se mantienen atrapadas y concentradas en la matriz de las biopelículas, lo que contribuye a su protección y en consecuencia a su alta resistencia a los antimicrobianos (Broow *et al.*, 2000).

En esta población bacteriana existe una estrecha comunicación intercelular, que se ha denominado *quorum sensing* e involucra la regulación y expresión de genes específicos a través de moléculas de señalización. Simultáneamente, los microorganismos pueden producir sustancias para estimular la propagación de colonias e inhibir el crecimiento de otras, quedando los microorganismos patógenos en una posición favorable dentro de las biopelículas (Costerton *et al.*, 1987). Otra de las características de las biopelículas y de mayor interés para el hombre, es su resistencia a la defensa del hospedero y antimicrobianos. Los anticuerpos, es decir, las células del sistema inmune y los antimicrobianos no tienen acceso a los microorganismos patógenos debido al lugar que estos ocupan en las biopelículas (Stewart y Costerton, 2001).

Con el desarrollo de la tecnología médica, aparecieron materiales que permitían ser implantados en el organismo sin causar reacciones adversas; pero que generan nichos óptimos para la formación de biopelículas a pesar de los avances, como: los implantes de válvulas, de cadera, marcapasos e incluso implantes dentales de integración ósea (Donlan, 2001). Estos avances han ayudado a la comprensión de algunas bacterias formadoras de biopelículas, lo cual es muy importante para el control de muchas enfermedades, entre ellas, la tuberculosis, cuya bacteria escapa y se protege de las drogas y de los mecanismos efectores de eliminación del sistema inmune. Posiblemente

la bacteria permanezca en biopelículas en alguna parte del cuerpo (Graham, 2005).

Uno de los problemas en el campo industrial asociado a las biopelículas es la llamada bioincrustación (del inglés biofouling) que es la contaminación producida por la actividad microbiana sobre las diferentes superficies, generando corrosión de los equipos, cascos de barcos, tuberías y de campos petroleros. En el medio acuático, las biopelículas aparecen y se acumulan en todas las superficies sumergidas, naturales o artificiales, reduciendo así la eficiencia hidrodinámica de los barcos y sistema de propulsión. El musguillo que se forma sobre los cascos marinos es debido al desarrollo de biopelículas a base de algas unicelulares y bacterias (Lewin, 1984); al respecto, se están usando pinturas para evitar la adhesión y colonización sin efectividad clara, generando un indudable costo económico (Cooksey y Wiggelworth, 1992).

Existen diversas especies bacterianas capaces de formar biopelículas, las cuales son responsables de más del 60% de todas las infecciones microbianas (Kim, 2001). Dentro de las especies representativas tenemos: *E. coli*, causante de infecciones comúnmente repetitivas del tracto urinario, *Haemophilus influenzae*, responsable de causar infecciones de oído medio en niños, también se puede encontrar *Streptococcus*, *Fusobacterium* y *Porphyromona*, las cuales causan la común formación de placa bacteriana, la gingivitis y la periodontitis, y *Pseudomonas aeruginosa* causante de infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística, estas bacterias tienen la capacidad de causar daños de manera individual y formando agregados celulares (Collins, 1992; Doolittle *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1997; Lamont y Jenkinson, 1998).

Las biopelículas también son de mucha ayuda, debido a que pueden ser utilizadas para mejorar las condiciones de un sistema contaminado a través de la biorremediación. Los procesos para el tratamiento de aguas residuales son prácticamente sistemas de cultivos microbianos a gran escala que utilizan biopelículas, en los cuales, las sustancias orgánicas de desecho se degradan a dióxido de carbono, gas metano y otros nutrientes inorgánicos (Grady y Lin, 1997). Las

Biopelículas utilizadas para la biorremediación de aguas residuales están conformadas básicamente por especies de *Pseudomonas*, *Corinebacterias*, *Micobacterias* y algunas levaduras (Betancourt *et al.*, 2004).

Pseudomonas aeruginosa pertenece al grupo de los Bacilos Gram Negativos No Fermentadores (BGNNF) aerobios, no esporulados, que degradan los hidratos de carbono por vía oxidativa (Koneman *et al.*, 2004). Se aíslan de muestras de suelo, aguas contaminadas, así como, de plantas y animales (Palleroni, 1984); son consideradas potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar a plantas como *Arabidopsis thaliana* (Rahme *et al.*, 2004), a invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (Tan *et al.*, 1999) y a insectos como *Drosophila melanogaster* (D'Argenio *et al.*, 2001).

En general, las bacterias *Pseudomonas* incluidas en el género *Pseudomonadaceae*, no son exigentes y crecen fácilmente en los medios de cultivo de rutina. Algunas características propias, como el olor a uvas y la pigmentación de la colonia, ayudan a ubicar inicialmente al microorganismo; la producción de citocromo – oxidasa, visualización de bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos en preparaciones coloreadas por el método del Gram, utilización de glucosa y otros hidratos de carbono por la vía oxidativa y no fermentativa, pueden clasificar presuntivamente al género *Pseudomonas*. No obstante la clasificación final debe ser complementada con otras reacciones bioquímicas, tales como, reducción de nitratos, crecimiento a 42°C y licuefacción de la gelatina para la caracterización de las especies (Esnard y Díaz, 1997; Rowland , 1999; Murray *et al.*, 2000).

En Venezuela, *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias más temidas, ya que se ha asociado con altos índices de morbilidad, produciendo bacteremias en pacientes hospitalizados y contaminación en diversos sistemas de agua, debido a la elaboración de productos celulares y extracelulares implicados en su patogenicidad (Madigan *et al.*, 1999)

Como el agua es un recurso imprescindible para la vida humana y para el desarrollo socioeconómico, industrial y agrícola, al contaminarse puede plantear un problema de salud pública. Al respecto, el grupo de expertos sobre aspectos Científicos de Contaminación Marina (CESAMP) advierte la necesidad imperativa y urgente de crear programas de monitoreos continuos de estos ecosistemas acuáticos, especialmente ríos y áreas costeras, para obtener información que permita diseñar planes de control, ordenación, manejo y uso de los cuerpos de agua (Taylor, 1993).

En el Estado Sucre, uno de los ríos más importantes, es el río Manzanares cuya contaminación ambiental es bastante acentuada, esto a consecuencia de todas las actividades que se realizan a lo largo de toda su cuenca: actividad agrícola, asentamientos humanos, empresas que explotan arena del río, procesadoras de alimentos, fábricas de licores y mercados de abastecimiento popular, cuyos desechos son vertidos sin tratamientos a este río (Márquez, 2002). Las biopelículas tienen cualidades magníficas para eliminar elementos contaminantes del ambiente, es por esto que pueden ser involucradas en la generación de ambientes bioregenerativos donde el agua, el aire y los suelos se pudieran utilizar con el fin de no perder estos elementos tan valiosos del ecosistema (Madigan *et al.*, 1999).

En los últimos años, la progresiva degradación de este ecosistema ha sido demostrada y las autoridades competentes han hecho caso omiso a las recomendaciones presentadas por diversos investigadores. En el país poco han sido los estudios enfocados a la identificación y caracterización de microorganismos productores de biopelículas responsables de conferir resistencia a los antimicrobianos; por lo que, el presente trabajo tuvo como finalidad detectar la producción de biopelículas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de muestras de sedimento provenientes de la Cuenca del río Manzanares ubicado, en la ciudad de Cumaná, que influyen en la calidad del agua y que a su vez pueden ser utilizadas para la biorremediación del mismo.

METODOLOGÍA

Descripción del área de estudio

La Cuenca del río Manzanares se ubica en el estado Sucre, Venezuela. Tiene su nacimiento en el macizo montañoso del Turimiquire, en la cordillera de la costa, a 2 300 m de altitud fluye a lo largo de 300 Km y drena una cuenca de, aproximadamente, 1 000 Km². Este río integra, con los ríos Neverí y Guarapiche, el sistema fluvial de la costa oriental venezolana, factor fundamental, tanto en la fundación como en la consolidación de la ciudad de Cumaná, estado Sucre (figura 1) (Márquez, 2002).



Figura 1. Cuencas hidrográficas del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre.

Muestra

Para la realización del presente estudio, se analizaron muestras de sedimento obtenidas de los bordes u orillas del río Manzanares de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Las cuales se obtuvieron por duplicado a todo largo y ancho de la Cuenca,

representadas específicamente por diferentes estaciones: Mercado Municipal, los dos Ríos y las Fraguas respectivamente por un período de seis meses (febrero – agosto).

Recolección y transporte de las muestras

Las muestras de sedimento provenientes de los márgenes del río Manzanares Cumaná, estado Sucre, se recolectaron en envases plásticos estériles (Hagedorn *et al.*, 1987). Posteriormente, se transportaron al Laboratorio de investigación Bacteriológica (LABIB) del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, se emplearon medidas de asepsia, con el fin de preservar las condiciones microbiológicas.

Después de transportar las muestras al laboratorio, se procedió a pesar 1 g de la muestra de sedimento en un tubo prepesado de 10 ml, agregando luego 10 ml de buffer estéril de sulfato de magnesio (MgSO_4) 0,1 g/mol, con el fin de disolver las bacterias de las partículas del suelo. A partir de la mezcla anterior se realizaron diluciones seriadas de la muestra con solución salina fisiológica, desde 10^{-1} a 10^{-10} . Posteriormente, a partir de la dilución 10^{-3} , se tomaron alícuotas de 1ml añadiéndose, en placas estériles previamente rotuladas, agregando luego 15 ml de agar fundido Infusión Cerebro Corazón. Las placas fueron incubadas a 32°C por 24 horas (Hagedorn *et al.*, 1987). A partir de las placas de agar infusión cerebro corazón se procedió a seleccionar las colonias de interés verificando las características macroscópicas como tamaño, forma, color, olor y producción de pigmento; luego se realizaron extendidos de las colonias seleccionadas y se colorearon Gram, observándolas al microscopio para verificar la presencia de bacilos Gram negativos (Hucker y Conn, 1923).

Siembra

Una vez seleccionadas las colonias presuntivas del género a identificar, estas fueron sembradas en agar nutritivo y MacConkey, mediante la técnica de siembra por estrías con asa de platino e incubadas a 32°C por 24 a 48 horas, obteniéndose colonias

aisladas y purificadas, comprobándose la presencia de bacilos Gram negativos lactosa negativo.

Identificación bioquímica

La caracterización fenotípica de los aislados bacterianos se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales, según Koneman *et al.* (2004), empleando las siguientes pruebas: Fermentación de glucosa y lactosa en agar kligler, oxidasa, motilidad, oxidación-fermentación de azúcares glucosa, maltosa, manitol y sacarosa, crecimiento a 42°C, hidrólisis de la arginina y descarboxilación de lisina,

Fermentación de azúcares

A partir del agar MacConkey, se tomó un inóculo de las colonias y se procedió a sembrar en agar kligler para demostrar el carácter no fermentador de azúcares, mediante la técnica de punción y estrías, y se incubó a 32°C por 24 a 96 horas. La no fermentación de los azúcares se verificó por la ausencia en el cambio de color del indicador rojo de fenol.

Oxidasa

La producción de la enzima citocromo-oxidasa es una prueba que permite diferenciar a *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las *Enterobacterias*. Para esta prueba se utilizó el reactivo dihidrocloruro de tetrametilparafenilendiamina al 1%, dispensando unas gotas en papel filtro Whatman nº 5 y luego, con un palillo de madera, se colocó una colonia característica, tomada a partir del crecimiento en agar nutritivo. La aparición de un color púrpura en un lapso de 20 segundos, indicó una reacción positiva sugestiva de especies del género *Pseudomonas*.

Motilidad

Se realizó mediante la siembra por punción en agar motilidad. Esta prueba determina la capacidad móvil por parte de los microorganismos. La lectura inicial se realizó a las 24 a 48 horas. La positividad de la prueba se evidenció mediante la

presencia de turbidez y la negatividad de la prueba (sin motilidad) por la ausencia de turbidez alrededor de la punción, manteniéndose el medio claro alrededor.

Oxidación de Azúcares

La oxidación de los azúcares glucosa, manitol, maltosa y sacarosa se evidenció mediante la inoculación por duplicado en tubos que contenían medio basal oxidación– fermentación (O/F), con 1% de carbohidratos, de los cuales uno se selló con parafina líquida estéril. Esta prueba se incubó a 32°C por 24 a 96 horas. Las reacciones oxidativas se evidenciaron por un cambio del indicador de verde a amarillo debido a la presencia de ácido, en la parte superior del medio inoculado.

Descarboxilación de la lisina

Esta prueba permite medir la capacidad enzimática de las bacterias para descarboxilar lisina y formar una amina. Se inoculó el medio con el microorganismo a estudiar, y los tubos fueron sellado con parafina líquida para proporcionar un ambiente anaeróbico y se incubaron a 32°C por 24 a 96 horas. La positividad de la prueba se evidenció al observarse el color púrpura en el medio y la negatividad por la observación de un color amarillo.

Hidrólisis de la arginina

Esta prueba demuestra si las bacterias en estudio son capaces de hidrolizar el aminoácido arginina través del sistema arginina dihidrolasa. Se inoculó el medio arginina con el microorganismo de interés, y los tubos fueron sellados con parafina líquida para proporcionar un ambiente anaeróbico y controlar el pH del medio, luego se incubaron hasta por 4 días a 32°C. La positividad de la prueba se evidenció al observarse el color púrpura en el medio y la negatividad, por la observación de un color amarillo.

Crecimiento a 42°C

Constituye una prueba diferencial entre las especies de *Pseudomonas*, a través de esta se verificó la capacidad de las bacterias de crecer a altas temperaturas. Se realizó por medio de la siembra de las cepas de interés en agar MacConkey, y posteriormente se incubaron a 42°C durante 24 horas.

Determinación de la presencia de exopolisacáridos para la formación de biopelículas a través del método del agar rojo congo:

Una vez identificada la especie bacteriana se procedió a realizar una suspensión bacteriana, la cual se incubó a 32°C por 24 horas y posteriormente se sembró por estrías en cada una de las placas de agar nutritivo con 0,025% del indicador rojo congo, el cuál induce una morfología colonial característica de las cepas según produzcan o no exopolisacáridos, las placas fueron incubadas a 32°C por 18 - 24 horas. En esta técnica las células bacterianas tienen la habilidad de unirse al pigmento, mientras que el exopolisacárido mucoide no y por lo tanto las cepas productoras de este material no se tiñen con el indicador rojo congo (Bravo *et al.*, 2005).

Determinación de la adherencia y formación de biopelículas a través del método de Safranina en tubo o macrométodo en tubo

La bacteria en estudio fue inoculada en 2 ml del medio infusión cerebro-corazón contenido en un tubo de ensayo de vidrio, luego esta suspensión bacteriana se incubó por 24 horas a 32°C, posteriormente se procedió a eliminar el contenido del tubo y se colocaron 2 ml de safranina al 1%; el tubo se roto cuidadosamente durante 3 minutos a temperatura ambiente para asegurar una tinción uniforme del material adherido a las paredes; posteriormente se eliminó el contenido y se lavo el tubo con agua destilada dos veces; finalmente los tubos se dejaron secar. Se consideró la prueba positiva cuando se observó la formación de una película teñida en la superficie interna del tubo que se cuantificó en cruces (+), según el método descrito por Christensen *et al.* (1982).

Para el control de calidad de las técnicas empleadas en la determinación de

exopolisacárido se utilizó una cepa certificada de *Pseudomonas aeruginosa* P001 del Instituto de microscopía electrónica “Dr Ernesto palacio” de la Universidad de los Andes.

Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos

Para la realización de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se empleó el método de difusión en agar descrito por Bauer *et al.* (1966). El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se inocularon de 4 a 5 colonias aisladas del microorganismo identificado en 4,5 ml de solución salina fisiológica al 0,85% hasta observar turbidez ajustándolo con un patrón 0,5 de la escala de Mac Farland. Luego se humedeció un hisopo de algodón estéril con la suspensión bacteriana eliminándose el exceso de material en las orillas del tubo de ensayo, por último se procedió a diseminar sobre la superficie de la placa de agar Múeller Hinton en tres direcciones. Se dejó secar de 3 a 5 minutos y luego, se procedió a colocar los discos de antibióticos de elección: ceftazidimida (30 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina (100 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), tobramicina (10 µg) y aztreonam (30 µg), todos de la marca comercial OXOID. Las placas se incubaron a 32°C durante 24 horas en aerobiosis, al cabo de este tiempo se procedió a realizar la lectura de los halos de inhibición. Esto permitió dependiendo del tamaño y siguiendo los valores de referencia clasificarlos en sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), según las categorías establecidas internacionalmente por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, del inglés, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2007).

Los resultados de resistencia y sensibilidad bacteriana permitieron agrupar estas cepas en fenotipos diferentes, tomando en consideración los patrones de susceptibilidad expresados por cada una de ellas, de esta forma se ubicaron dentro de un mismo fenotipo común y se designó para su clasificación en números romanos.

Para el control de calidad de los discos de antibióticos utilizados se empleó la cepa control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos fueron expresados en tablas y/o gráficos de frecuencia. Los patrones de susceptibilidad antimicrobiana fueron expresados en porcentajes de resistencia y sensibilidad. Para relacionar la formación de biopelículas y los perfiles de resistencia se aplicó el análisis Anova (Sokal y Rohlf, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos puros no existen en el medio natural, sino que los microorganismos se combinan en grandes colonias limosas donde los diversos individuos establecen relaciones y dependencias (Wimpenny, 2000).

Los análisis microbiológicos en las muestras ambientales permitieron la identificación de 18 cepas, obteniéndose 16 cepas (88,89%) de *Pseudomonas aeruginosa* y 2 cepas (11,11%) de *Pseudomonas sp.*, provenientes de la gran biodiversidad del río (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas sp.* provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre.

Microorganismo	Nº	Porcentajes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	88,89%
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	11,11%
Total	18	100,00%

Nº: número total de aislados.

Pseudomonas aeruginosa, constituye uno de los grupos microbianos más abundantes en la naturaleza, distribuidas en aguas, plantas e intestino de animales, pero particularmente se encuentran como constituyentes de la microflora del suelo (Hardalo y Edberg, 1997). Ha sido involucrada tanto en la actividad desnitrificante del suelo como en los procesos de patogenicidad oportunista en el hombre (Govan, 1996), esta bacteria es capaz de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, además de presentar una alta capacidad de reacción a señales físico químicas y biológicas (Arraíz, 2001). Así mismo este microorganismo excreta ciertos glicolípidos con actividad tenso activa que posee aplicación potencial en el área médica, ambiental y en la industria petrolera (Stoodley *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados

Löchs *et al.* (2004), en el cual aislaron 47 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de aguas subterráneas, superficiales y de red. Por otro lado Albarado y Flores (2008), reportaron 24 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras de suelo. Este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza; en ambientes acuosos esta bacteria es capaz de adherirse a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelículas.

En la figura 2, se puede observar que el perfil bioquímico de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se mantuvieron homogéneas en la mayoría de las cepas, que se refleja en el 100,00% de positividad de las pruebas oxidasa, motilidad, crecimiento a 42°C y OF glucosa, además de la descarboxilación de la arginina con 75,00% de cepas positivas. Las pruebas que menos se ajustaron al perfil tipo para la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) fueron: descarboxilación de lisina (31,25%), OF sacarosa (31,25%) OF maltosa (43,75%) y OF manitol (25,00%); Estos resultados se ajustan a los patrones de identificación para BGNNF descritos por Koneman *et al.* (2004), corroborando que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* poseen las mismas características de identificación tanto en ambientes naturales como hospitalarios.

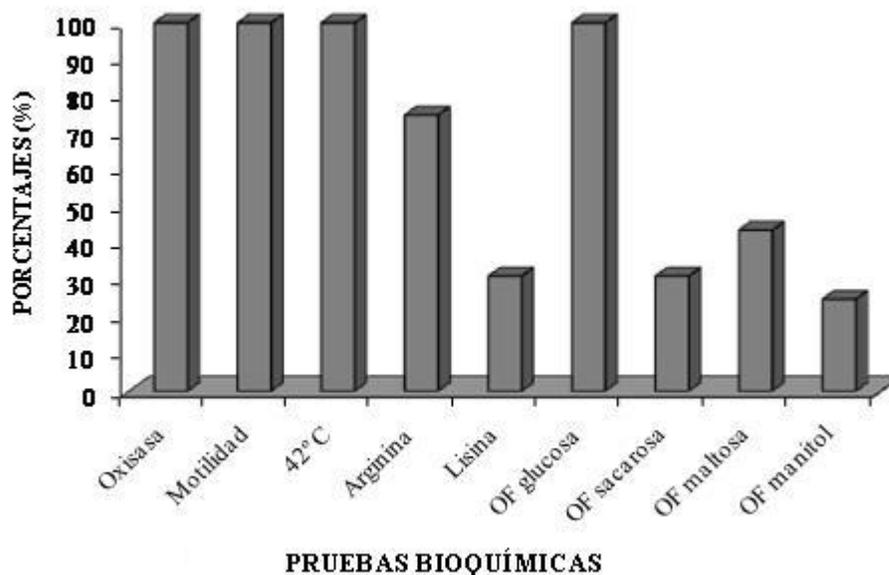


Figura 2. Perfil bioquímico de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del río Manzanares de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

La resistencia bacteriana observada en los 16 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, muestra que el mayor porcentaje fue para aztreonam (56,25%), seguido de gentamicina (43,74%) y tobramicina (37,50%). Con respecto a los antimicrobianos ceftazidime, piperacilina, meropenem y piperacilina/tazobactam 18,75% de las cepas fueron resistentes a los mismos. En el caso del imipenem solo el 12,50% de las cepas presentó resistencia y el 6,25% de estas fue resistente a la ciprofloxacina (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre.

Antimicrobianos	Nº	% Resistencia	Nº	% Sensibilidad
Ciprofloxacina	1	6,25	15	93,75
Ceftazidime	3	18,75	13	81,25
Piperacilina	3	18,75	13	81,25
Aztreonam	9	56,25	7	43,75
Gentamicina	7	43,75	9	56,25
Tobramicina	6	37,50	10	62,50
Meropenem	3	18,75	13	81,25
Imipenem	2	12,50	14	87,50
Piperacilina/tazobactam	3	18,75	13	81,25

N|º: número de cepas.

La resistencia mostrada por estas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, frente al aztreonam, puede deberse a la presencia de mecanismos de resistencia como el aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de eflujo, las cuales son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos; la expresión de estas bombas puede ser permanente o intermitente (Suarez *et al.*, 2006). Por otro parte Livermore (2002), señala que la resistencia a los aminoglucósidos pudiera estar asociada a la disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa debido a la disminución en la expresión de las porinas. Sin embargo, en el presente

estudio no se determinó cuál o cuáles de estos mecanismos estuvieron implicados en la resistencia a estos antimicrobianos.

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo que presenta resistencia a la mayoría de los antimicrobianos, es por ello que ha sido objeto de numerosas investigaciones (Arraiz, 2001). Lösch *et al.* (2004), determinaron la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen ambiental, encontrando altos porcentajes de sensibilidad frente a los carbapenemos (97,80%), ceftazidima (100,00%) y ciprofloxacina (100,00%), además de reportar elevados porcentajes de cepas resistentes a la gentamicina (27,00) y tobramicina (23,00). Por otro lado, estudios realizados por Luján *et al.* (2008) encontraron que el 62,00% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras nosocomiales presentaron resistencia al aztreonam. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, donde se observaron altos porcentajes de sensibilidad antimicrobiana a la mayoría de los antibióticos empleados.

En América Latina se evidencia que la resistencia antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa* a los agentes de mayor uso en el tratamiento de las infecciones producidas por este germen, se ha incrementado significativamente en un corto periodo de tiempo (Andrade *et al.*, 2003). La sensibilidad que presentaron estas cepas ante los diversos agentes antimicrobianos, puede deberse al tipo de ambiente donde se desarrollan, ya que no están en constante contacto con antibióticos.

Según un informe publicado por el Organismo Internacional Alianza para el uso prudente de antibióticos, plantea que la resistencia de las bacterias continua siendo un problema serio en el mundo y particularmente en Latinoamérica, donde numerosos factores contribuyen a ello, los datos de susceptibilidad de antibióticos son escasos y la vigilancia de resistencia no está disponible en todos los países (Mata, 2002). Esta publicación difiere de la obtenida en el presente estudio donde los datos de sensibilidad resultaron ser los idóneos y esperados cuando se aplica un tratamiento antimicrobiano.

Sin embargo, es importante destacar que estas cepas que mostraron un alto porcentaje de sensibilidad, son de origen ambiental.

Los resultados de resistencia y sensibilidad bacteriana permitieron agrupar estas cepas en 7 fenotipos diferentes, siendo el más frecuente el fenotipo II. La diferencia en algunos casos estuvo demarcada por variaciones de uno o dos antibióticos entre los perfiles. El 62,50% de las cepas fue resistente a dos o más antibióticos, a excepción de las cepas clasificadas en el perfil II que fueron sensible a todos los antibióticos de elección. Los fenotipos que se presentaron con mayor frecuencia fueron el I y II, los cuales se encontraron en tres y seis cepas, respectivamente; también se observó que los fenotipos no fueron específicos de una sola estación, es decir, un solo fenotipo pudo estar presente en cualquiera de las tres estaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Patrones fenotípicos de susceptibilidad en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre.

FENOTIPO	N	ANTIMICROBIANOS								
		CIP	CAZ	PIP	ATM	GM	NN	ME	IPM	TZP
S								N		
I	3	S	S	S	R	S	S	S	S	S
II	6	S	S	S	S	S	S	S	S	S
III	1	S	R	S	R	R	S	R	S	R
IV	2	S	S	S	R	R	R	S	S	S
V	1	S	S	S	S	R	R	S	S	S
VI	1	S	S	R	R	R	R	S	S	S
VII	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R

N: número total de cepas, CIP: Ciprofloxacina, CAZ: Ceftazidime, PIP: Piperacilina, ATM: Aztreonan, GM: Gentamicina, NN: Tobramicina, MEM: Meropenem, IPM: Imipenem, TZP: Piperacilina/tazobactan.

En el fenotipo VII se pudo observar que las dos cepas incluidas en este, presentaron resistencia a todos los antimicrobianos de elección y no fueron capaces de producir exopolisacárido; esta resistencia pudiera estar asociada a la procedencia de estas cepas, ya que fueron aisladas en la estación 1 (Mercado Municipal), cuya contaminación es bastante acentuada. Por otro lado, la producción de exopolisacárido pudo verse afectada por factores ambientales, que impidieron la

unión de las células bacteriana a la superficie, también pudo haber influido errores en las técnicas empleadas en el presente estudio como: preparación del agar rojo congo, pH de este medio de cultivo, limpieza de los tubos de ensayos y tiempo de incubación.

Al determinar la presencia de exopolisacárido para la formación de biopelículas a través del método del agar rojo congo, se observó que de las 16 cepas en estudio, 14 resultaron ser productoras de exopolisacárido (87,50%), representadas por colonias blancas y solo 2 cepas mostraron colonias rosadas (12,50%), considerando a estas cepas como no productoras de exopolisacárido (Figura 2).

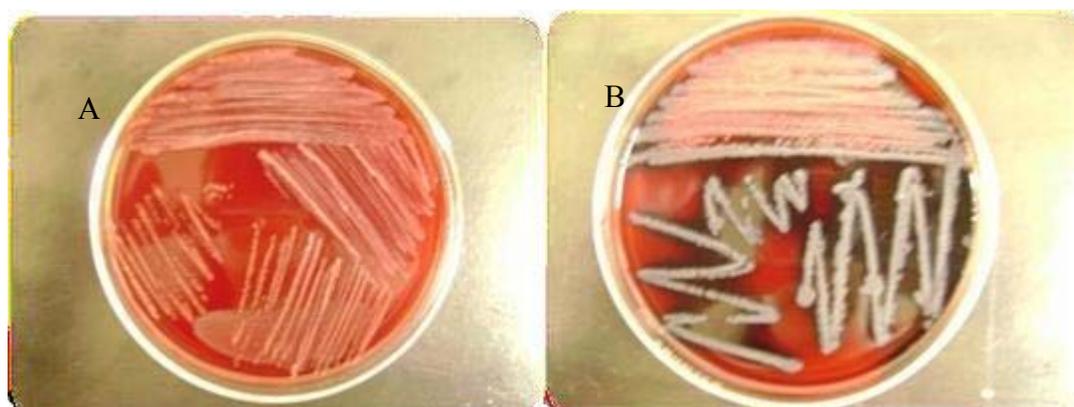


Figura 3. Producción de exopolisacárido determinadas a través del método del agar rojo congo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre. Morfología típica de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* por el método del agar rojo congo. A): Colonias rosadas (no formadoras de biopelículas), B): Colonias blancas (formadoras de biopelículas).

La siembra en agar rojo congo induce una morfología colonial característica de las cepas según produzcan o no exopolisacáridos y la producción de este compuesto es un importante factor de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*, ya que esta bacteria tiene la capacidad de producir esta matriz que es la que interactúa con el medio externo (Callicó *et al.*, 2003). El crecimiento de las colonias blancas en el agar rojo congo, sugiere un incremento en la producción de exopolisacárido, lo que previene la toma del colorante,

debido a que es la célula bacteriana que se une al indicador y no la matriz exopolisacárida (Chung *et al.*, 2003).

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

Algunas cepas no fueron capaces de formar biopelículas, esto puede deberse a diversos factores ambientales que afectan el proceso de formación de estas biocapas, como: el flujo de líquido, que es el principal factor que afecta tanto a las especies móviles como inmóviles, la hidrofobicidad, ya que la carga de la superficie también influye en la adhesión bacteriana, la temperatura, el pH, la salinidad y la concentración de oxígeno, también interfiere en cada una de las etapas de formación de las biopelículas bacterianas (Kraigsley *et al.*, 2002). Un 95,00-99,00% de los microorganismos se desarrollan formando biopelículas, ya que en la naturaleza, la vida microbiana está estructurada como una asociación en lugar de células planctónicas u organismos flotando libremente (Herrera, 2004).

El Instituto Nacional de Salud de EE.UU publicó que más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por cepas formadoras de biopelículas, de igual manera se les atribuye el 60% de las infecciones nosocomiales; incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la morbilidad y mortalidad; sin embargo, la presencia de biopelículas no siempre acarrea problemas; el hecho de que estas organizaciones degraden materia orgánica y ambiental, ha impulsado a los microbiólogos y ambientalistas a utilizarlas en todos los campos donde se requiera biorremediar (Herrera, 2004).

Debido a los escasos estudios realizados sobre microorganismo formadores de biopelículas proveniente de muestras ambientales, fue necesario comparar dichos resultados con cepas de origen nosocomial, encontrándose que la formación de biopelículas es independiente de las variaciones morfológicas y de los patrones de resistencia.

Callicó *et al.* (2004) reportaron 72,00% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de colonias blancas, estos resultados coinciden con los del presente estudio donde el 87,50% de las cepas fueron formadoras de biopelículas a través de este método. En este mismo orden de ideas, Bravo *et al.* (2005) reportaron altos porcentajes (75,00%) de cepas de *Plesiomonas shigelloides* formadoras de biopelículas, evidenciadas a través de la producción de las típicas colonias blancas en agar rojo congo. Es importante mencionar que las cepas utilizadas por estos autores son de tipo clínico y no ambiental, corroborando de esta manera que las bacterias pueden formar biopelículas en todo tipo de hábitat, bien sea con el fin de crear resistencia o de sobrevivir a un determinado ambiente.

La producción de exopolisacárido en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, también fueron evaluadas por el método de la safranina en tubo, obteniéndose los siguientes resultados: de las 16 cepas en estudio, 14 (87,50%) fueron capaces de formar anillos alrededor del tubo de ensayo, indicando la producción de exopolisacárido por estos microorganismos, lo cual beneficia a estas bacterias durante adhesión a diferentes superficies inertes y a otras células, sin embargo, sólo 2 cepas (12,50%) no fueron capaces de formar los anillos, por lo tanto, se consideran como no productoras de exopolisacárido. El tamaño de los anillos formados por estas cepas fue designado a través de cruces (+) (Figura 4).

Los microorganismos comúnmente se adhieren a superficies tanto vivas como inertes; para tal fin, estos se valen de estructuras celulares superficiales como: fimbrias, lipopolisacáridos extracelulares (LPS), los polímeros extracelulares (EPS), flagelos y otras proteínas (Herrera, 2004). Una vez que los organismos entran en contacto con la

superficie, cualquier posible interacción está gobernada por reglas físico-químicas y biológicas (Betancourt *et al*, 2004), que van a modular la regulación de genes que ocurre en el interior de la célula microbiana, es decir, para que los microorganismos puedan colonizar y asociarse con el sustrato, deben vencer ciertas características del medio como: la velocidad del flujo adyacente a la superficie y la repulsión hidrostática inicial que se establece entre la célula y la superficie (Dolan, 2002).

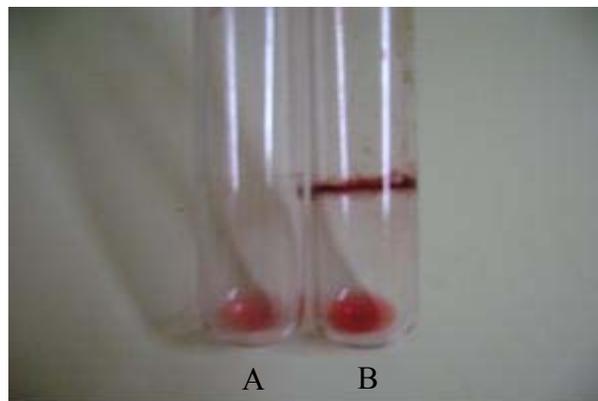


Figura 4. Producción de exopolisacárido determinadas a través del método de la safranina en tubo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras sedimento de los márgenes del río Manzanares, Cumaná, estado sucre. A): bacteria no formadora de biopelículas, B): bacteria formadora de biopelículas.

Durante el proceso de formación de las biopelículas, los flagelos además de servir como adherentes a las superficies, están encargados de vencer la fuerzas de repulsión inicial, mientras que los polímeros de superficie con sitios no polares como las fimbrias y componentes de ciertas bacterias Gram negativas (Acido micólico) parecen dominar la adhesión a sustratos hidrofóbicos y los polímeros extracelulares (EPS) y los lipopolisacáridos son más importantes en la adhesión a sustratos hidrofílicos (Lasa *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque la motilidad y la presencia de flagelos ayudan al proceso adhesión bacteriana a distintos sustratos, esto no parece ser un requisito esencial, muchas bacterias Gram positivas inmóviles como *Estafilococos*, *Streptococos* y *Micobacterias*, son capaces de formar biopelículas, utilizando proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en la primera etapa de adherencia (Cucarella *et al*, 2001).

Se han empleado diferentes métodos para evaluar la producción de biopelículas, en la actualidad las técnicas más utilizadas son el micrométodo en placa de microtitulación y el método de safranina en tubo, siendo este último el empleado en el presente estudio.

Las cepas aisladas en las tres estaciones originaron exopolisacárido en cantidades variables, identificadas por la formación de un anillo, cuya producción fue por el grosor del anillo formado en el interior de las paredes del tubo de ensayo. En la estación 1 (Mercado municipal) se observó que las cepas formaron todos los anillos de producción de exopolisacárido y también la no producción por parte de algunas bacterias de este material; los anillos característicos de esta estación fueron los de cuatro cruces (++++) en las cepas 05, 013 y 016, mientras que el de tres cruces (+++) solo lo formó la cepa 02, seguido de los anillos de dos cruces(++) en las cepas 04, 06, 010 y 015; la de una cruz (+) se evidenció en el aislado 014 y las cepas 021 y 022 no formaron el anillo característico, considerando a estos microorganismos como no productores de exopolisacárido.

En la estación 2 (Los dos ríos), estuvo representada por las cepas 017, 018, 019 y 020 solo formaron anillos de dos cruces (++); y por último en la estación 3 (Las fraguas) solo se identificó una sola cepa de *Pseudomonas aeruginosa* la 012, la cual formó un anillo de tres cruces (+++). El anillo formado con mayor frecuencia fue el de dos cruces (++) , identificado en 8 cepas, provenientes de las estaciones 1 y 2 respectivamente.

Es importante mencionar que la estación 3 se encuentra más alejada de los caseríos y de las actividades recreacionales ejercidas por el hombre, a diferencia de la estación 2 que se encuentra cerca de un balneario utilizado con fines recreacionales y la estación 1 se encuentra detrás del mercado municipal, presentando mayor grado de contaminación debido a todas las actividades que se realizan alrededor del mismo, esto explicaría por qué se obtuvieron 11 aislados *Pseudomonas aeruginosa* en el mercado municipal, 4 en los dos ríos y solo una en las fraguas .

El método de la safranina en tubo es una prueba semicuantitativa, la cual presenta subjetividad y discrepancia en la lectura e interpretación de sus resultados, por lo cual fue necesaria la valoración en por lo menos cuatro oportunidades, (Mattar *et al.*, 2006)., Estudios realizados por Moreno y Ruiz (2007) encontraron que el 63,82% de las cepas de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de muestras de pacientes con blefarconjuntivitis formaron anillos en los tubos de ensayos, indicando la producción de exopolisacárido. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, donde se encontraron altos porcentajes (87,50%) de cepas productoras de exopolisacárido por el método de la safranina en tubo, lo que permitió corroborar la asociación de dicha característica con la adherencia bacteriana.

Las bases genéticas de la formación de biopelículas en las cuales los flagelos y pilis son utilizados, han sido ampliamente documentados para algunas especies bacterianas incluyendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* (Pratt y Kolter, 1998; O'Toole y Kolter, 1998; Watnitck y Kolter 1999). La motilidad, otorgada por flagelos, ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente (Lasa *et al.*, 2005).

Tabla 4. Relación de la formación de biopelículas con el perfil de susceptibilidad de las especies de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras de sedimento de los márgenes del río Manzanares de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepas Sensibles	Cepas Resistentes	Nº total de cepas	Valor P
FB	11	3	14	0,0142*
NB	0	2	2	0,0200*

P<0,05 *Diferencias significativas, FB: formadoras de biopelículas, NF: No formadoras de biopelículas.

Al relacionar la formación de biopelículas de los aislados provenientes de la cuenca del río Manzanares con los perfiles de susceptibilidad, a través de la prueba Anova, se obtuvieron, diferencias significativas (P < 0,05), lo que nos indica que la producción de biopelículas puede presentarse en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y en

otras no, indistintamente de que sean resistentes o no al antimicrobiano, en el caso específico de las cepas estudiadas, provenientes de ambientes naturales. Estos datos permiten inducir que estas cepas forman estos agregados celulares como mecanismos de protección contra las influencias exógenas dañinas presentes en este medio acuoso, para permanecer en este ambiente y no con el fin de crear resistencia frente antimicrobianos; como en el caso de las cepas de origen nosocomial.

Entre los beneficios atribuidos a los exopolisacáridos bacterianos como parte integral de su estructura organizacional, se destaca que actúan como mecanismos de concentración de nutrientes (Gilbert *et al.*, 1997), previenen el acceso de ciertos agentes antimicrobianos o restringen la difusión de los antibióticos al interior de estos (Danese *et al.*, 2000).

El proceso de formación de las biopelículas también se encuentra regulado por un sistema de señales químicas denominado *Quorum sensig*, el cual es el encargado de mantener la estabilidad dentro de la estructura de las biopelículas, a través de la expresión de ciertos genes, ya sea por expresión o represión de los mismos; ayudando a la adaptación y virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* a su ambiente (Arráiz, 2001). Esto explicaría por qué las células de vida planctónica se comportan diferentes a los microorganismos que se encuentran en biopelículas, con respecto a la tasa de crecimiento y habilidad para resistir a tratamientos antimicrobianos (Rivera y Mendéz, 2005).

En los ambientes acuoso este microorganismo se adhiere a superficies produciendo una especie de agregado llamado biopelículas, con el fin de protegerse y sobrevivir a estas condiciones adversas, y a su vez son empleadas para mejorar las condiciones de un sistema contaminado (Costerton *et al.*, 1994); por todas estas propiedades, no es sorprendente que *Pseudomonas aeruginosa* se considere como un paradigma de versatilidad metabólica y claves en el reciclado de materia orgánica en los compartimientos aeróbicos de los ecosistemas, jugando un papel esencial en la mejora y mantenimiento de la calidad medioambiental.

CONCLUSIONES

Se aislaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en las diferentes estaciones estudiadas, las cuales fueron identificadas a través de métodos bioquímicos convencionales.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron diferentes perfiles de resistencia, con variaciones de uno o más antimicrobianos entre ellos.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos empleados excepto a gentamicina, tobramicina y aztreonam.

Se demostró la producción de biopelículas en catorce de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* determinados por el método del rojo congo y el método clásico de la safranina en tubo.

Los patrones de resistencia de las cepas estudiadas, no estuvieron relacionados con la formación de agregados celulares o biopelículas, ya que tanto las cepas resistentes como sensibles a los antibióticos de elección fueron capaces de formar biopelículas.

BIBLIOGRAFÍA

Albarado, L. y Flores, E. 2008. Evaluación de la coloración diferencial de fluoresceína modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo. *Kasmera*. 36 (1): 17 – 27.

Andrade, S.; Philip, S. y Jones, R. 2003. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J. Antimicrob. Chemother.*, 52: 140 - 141.

Arráiz, N. 2001. “*Quorum Sensig*” y virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasm. Maracaibo*. 29(1): 97 - 118.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Prueba de susceptibilidad Antimicrobiana por método estandarizado. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493 - 496.

Bravo, L.; Salazar, D.; Arce, M.; García, Hilda.; Ramírez, M.; Cabrera, E.; Fernández, A. y Castañeda, N. 2005. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas en animales domésticos y afectivos. *Rev. Elect. Vet.*, 6(11): 29 - 33.

Betancourt, B.; Botero, J. y Rivera, S. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb. Med.*, 35(1): 34 - 39.

Brooks, W.; Demuth, S. y Lamont, R. 1997. Identification of a *Streptococcus gordii* domain that mediates adhesion to *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, 65: 3753 -3758.

Broow. A.; Liu, S. y Lewis, K. 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 44: 640 - 646.

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

Costerton, J. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Indus. Microbiol.*, 15: 137 - 140.

Costerton, J.; Cheng, K. y Geesy, G. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 435 - 464.

Costerton, J.; Lewandowski, Z.; DeBeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D. y James, G.

1994. Biofilms the customized microniche. *J. Bacteriol.*, 176: 2173 - 2242.

Consterton, J.; Philip, S. y Greenberg, E. 1999. Bacterial biofilm: A common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318 - 1322.

Cooksey, K. y Wiggelworth, B. 1992. Biofilm in drinking water distribution systems. *Science.*, 22(6): 469 - 485.

Collins, S. 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implication. *Science*, 256 : 774 - 779.

Cucarella, C.; Solano, C.; Valle, J.; Amorena, B.; Lasa, I. y Penades, J. 2001. *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 183: 288 - 296.

Chmielewski, R. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *J. Bacteriol.*, 2: 22 - 32.

Christensen, G.; Parísi, J.; Bisno, A. y Simpsom, W. 1982. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.*, 37: 318 - 326.

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

Chung, J.; Altman, E.; Beveridge, T. y Speert, D. 2003. Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: Implication in exopolysaccharide production, pilus expression, persistence in the mouse. *Infect. Immun.*, 71(2): 904 - 909.

Danese, P.; Pratt, L. y Kolter, R. 2000. Exopoly saccharide production is required for development of *Escherichia coli* K - 12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.*, 182(12): 3593 - 3596.

Davey, M. y O'Toole, G. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(4): 1092 - 2172.

Donlan, R. 2001. Biofilms and device – associated infections. *Emerg. infect. Dis.*, 7(2): 277 - 281.

Donlan, R. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 881-890.

Doolittle, M.; Cooney, J. y Caldwell, D. 1995. Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4. *J. Microbiol.*, 41: 12-18.

D' Argenio, D.; Gallargher, A.; Berg, A. y Mandil, C. 2001. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infec. J. Bacteriol.*, 183: 1466 - 1471.

Esnard, S. y Díaz, O. 1997. Identificación y caracterización de Bacilos Gram Negativos no Fermentadores en el medio hospitalario. *Rev. Cub. Hig. Epidemiol.*, 35(1): 30 - 37.

Grady, C. y Lin, J. 1997. *Biological water treatment theory and applications*. Marcel Decker Edit. New York.

Graham, H. 2005. El evitar los biofilms podría ayudar a combatir la tuberculosis. *Rev. Cell*, 17(1): 26 - 28.

Gilbert, P.; Das, J. y Foley, I. 1997. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.*, 11: 160 - 167.

Govan, J. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Rev. Microbiol.*, 60: 539 - 574.

Hagedorn, C.; Gould, T.; Bardinell. y Gustavson D. 1987. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2265 – 2268.

Hardalo, C y Edberg, S. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.*, 23(1): 47 - 75.

Hucker, G y Conn, H. 1923. Methods for Gram stainig. *Technique Bulletin*, 93(5): 1-37.

Kim, L. 2001. Riddle of Biofilm Resistencia. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22: 999 - 1007.

Koneman, E.; Altem, D.; Janda, W.; Schreckenberger, R y Winn, W. 2004. *Diagnóstico microbiológico*. Quinta edición. Edit.Med.Panam. Buenos Aires.

Kraigsley, A.; Ronney, P. y Finger, S. 2002. “ Hydrodynamic influences biofilm formationandgrowht”<<http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4web.html>.> (11/4/2001).

Lamont, R y Jenkinson, H. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Microbiol.*, 62: 1244 – 1263.

Lasa, I.; Penadés, J y Leiva, J. 2005. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit.*, 28(2): 163 - 175.

- Lewin, R. 1984. Microbial adhesion is a sticky problem. *Science*, 224: 375 - 377.
- Livermore, D. 2002. Multiple mecanismo of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 634 – 640.
- Lösch, S.; Merino, A. y Alonso, M. 2004. Resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco. *Inst. Med. Reg.*, 2: 43 -50.
- Luján, D.; Ibarra, J. y Mamani, E. 2008. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Biomed.*, 19: 156 - 160.
- Maestre, M. y Maestre, J. 2004. Biofilm; modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos, *Rev. Esp. Quimioterap.*, 17(1): 26 - 28.
- Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 1999. *Biología de los microorganismos*. Octava edición. Prentice Hall Iberia. Madrid.
- Mago, O.; Betancourt, J.; Castillo, F.; González, G. y Marín G. 2004. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa spp* Grupo fluorecens provenientes de diferentes centros de salud del Estado Nueva Esparta – Venezuela. *Kasm.* 32(2): 80 - 88.
- Márquez, A. 2002. Environmental conditions of the waters of the Manzanares River Sucre Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Ven.*, 41: 15 - 24.
- Marshall, K. 1992. Biofilms an overview of bacterial adhesion activity and control at surfaces. *Am. Soc. Microbiol.*, 58: 202 - 207.
- Mata, G. 2002. *Frecuencia de cepas Resistentes de P. aeruginosa causantes de infección intrahospitalaria en la unidad de cuidados intensivos del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”*. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de oriente, Cumaná, Venezuela.
- Máttar, S.; Cuevas, M.; Aldana, O.; Sussman, O. y Arango, I. 2006. Estudio microbiológico de *Staphylococcus coagulasa* negativos productores de biocapa mucoide (slime). *Infect. Immun.*, 59: 445 - 449.
- Miller, M. y Ahearn , D. 1987. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact I^{ef} substrata. *J. Clin. Microbiol.*, 25(8): 1392 – 1397.
- Moreno, M. y Ruíz, E. 2007. *Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en bleraconjuntivitis. *Rev. Med. Hosp. Gen.*, 70(1): 24 - 29.
- Murray, P.; Baron, E.; Pfaller, M.; Tenover, F. y Tenover, R. 2000. *Manual of Clinical Microbiology*. Séptima edición. Editorial Board. Washinton, D.C.

Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 67(1): 45 - 53.

O'Toole, G. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.*, 5: 49 - 79.

O'Toole, G. y Kolter. 1998. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 28: 449 - 461.

Palleroni, N. 1984. Family I. *Pseudomonadaceae*. *Bergey's Manual of Systema Bacteriology*. 1: 121 - 198.

Pratt, L. y Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: papels of flagella, motility, chemotaxis and tipe I pili. *Mol. Microbiol.*, 30: 2.

Rahme, L.; Walter, T.; Bais, H.; Déziel, E.; Schweizer, H.; Fall, R. y Vivanco, J. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* plant root interactions. Pahogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant. Physiol.*, 34: 320 - 331.

Rowland, B. 1999. *Pseudomonas* Infections. *Gal. Enc. Medic.*, 40: 1 - 3.

Singh, P. 2002. A component of innate immunity prevenst bacterial biofilm development. *Nature*, 417: 552 - 555.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1980. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. San Francisco, Estados Unidos.

Stoodle, P.; Dodds, I. y Boyle, J. 1999. Influence of hidrodynamic and nutrients of biofims structure. *Appl. J. Microbiol.*, 85: 518 - 519.

Suárez, C; Catan, J; Guzman, A.; y. Villegas, M. 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenemos en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Asoc. Colomb. Infect.*, 2: 10 - 16.

Stewart, P. y Costerton, J. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 14: 135 - 142.

Tan, M.; Majan, S.; Rahme, L. y Asubel, F. 1999. Molecular machanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa* Caenorhabditis elegans pathogenesis model. *Rev. Cell.*, 96: 47 - 56.

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

Vroom, J. De Grauw, K. y Gerritsen, H. 1999. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two photon excitation microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3502 - 3511.

Watnick, P. y Kolter, R. 1999. Step in the development of a *Vibrio cholerae* biofilms. *Mol. Microbiol.*, 34: 586 - 595.

Wimpenny, J. 2000. Heterogeneity in biofilms. *Rev. microbiol.*, 24: 667 - 671.

Whiteley, M. 2001. Genes expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413: 860 - 864.

HOJA DE METADATOS

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

Título	Aislados de Pseudomonas aeruginosa Formadoras De Biopelículas En La Cuenca Del Río Manzanares, Cumaná, Estado Sucre.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
González M. Marielys Y.	CVLAC	16 627 275
	e-mail	lauvimar@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Pseudomonas aeruginosa
Biopelículas
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Pseudomonas aeruginosa P001
Matriz exopolisacárida
Biorremediación

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis
	Bacteriología
	Microbiología

Resumen (abstract):

La producción de β -lactamasas puede estar codificada en genes cromosómicos y extracromosómicos, siendo en estos últimos mayormente encontradas. La transferencia de dichos genes, mediante conjugación, a partir de cepas de *Acinetobacter* ha sido escasamente descrita; por ello, con el propósito de demostrar la transferencia de genes de resistencia a β -lactámicos, a partir de cepas de *A. baumannii*, se estudiaron 20 cepas clínicas, las cuales fueron aisladas de pacientes recluidos en la unidad de cuidados intensivos y en la unidad de alto riesgo neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), previamente identificadas bioquímica y molecularmente. Se reactivaron las cepas preservadas en agar conservación. La susceptibilidad antimicrobiana ante 14 β -lactámicos se determinó mediante la prueba de difusión en agar. Se confirmó la resistencia de las cepas frente a la ceftazidima, el cual fue el antibiótico de elección para la conjugación a través de placas suplementadas con dicho antimicrobiano. La transferencia del material genético fue evaluada mediante conjugación bacteriana y se realizó con aquellas cepas resistentes a la ceftazidima y sensible a la rifampicina, utilizándose como cepa receptora la *E. coli* J53-2. Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a ampicilina, piperacilina y cefoxitin, el 95% fue resistente a cefotetan y cefuroxime y el 85% de las cepas presentó resistencia a la ceftazidima. La frecuencia de conjugación fue alta mostrando un valor de $2,1 \times 10^{-3}$ transconjugante/célula donante. Se obtuvo una cepa transconjugante productora de BLEE y, también, se observó transferencia de resistencia a cloranfenicol.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Araque, Yasmina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	yamasi@gmail.com
	e-mail	
	e-mail	
Martínez, Rosa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	rosa_m@hotmail.com
	e-mail	
	e-mail	
Dina, Antón	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	danton@cantv.net
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	02	11

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_MYGM	Application/ Word.doc

Alcance:

Espacial: Universal

Temporal: Intemporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado 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:

El autor garantiza en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de archivar y difundir, por cualquier medio, contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar a la Universidad de Oriente una suma destinada a recuperar parcialmente los costos involucrados. El autor se reserva los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.

Marielys González

Autor
González, M Marielys Y.

Yasmina Araque

Asesora
Araque, Yasmina

Rosa Martínez

Jurado
Martínez, Rosa

Dina Antón

Jurado
Antón, Dina

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

[Firma]

