



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

DETECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS NO
FERMENTADORES RESISTENTES A BETA-LACTÁMICOS, PROVENIENTES
DEL RÍO MANZANARES, ESTADO SUCRE

(Modalidad: Tesis de grado)

AURA ROSA NAZARET GUERRA

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

CUMANÁ, 2011


DETECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS NO
FERMENTADORES RESISTENTE A BETALACTÁMICOS, PROVENIENTES
DEL RIO MANZANARES, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:



MSc. Dina Antón
Asesora





ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGIA	6
Población y muestra	6
Viabilidad de las cepas.....	6
Análisis bacteriológico.....	6
Identificación bioquímica de los microorganismos	7
Carácter no fermentador:.....	7
Oxidasa.....	7
Agar motilidad	7
Oxidación de azúcares.....	8
Crecimiento a 42°C.....	8
Descarboxilación de lisina	8
Hidrólisis de la arginina	9
Hidrólisis de esculina	9
Licuefacción de la gelatina.....	9
Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana	10
Aislamiento de plásmidos	10
Visualización de moléculas plasmídicas	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES	29

BIBLIOGRAFÍA	30
HOJA DE METADATOS	39

DEDICATORIA

En primer lugar a Dios.

Dedico este trabajo de grado a quienes me dieron su amor y apoyo incondicional, y quienes estaban allí para recordarme que para triunfar hay que caer y levantarse:

Con amor y gratitud a mi madre Aura Rosa Guerra, gracias por hacer todo lo que estuvo a tu alcance y mas para que realizara mis sueños.

A

Mi Padre Eliso Nazaret.

Mi esposo Fram Medina, por estar conmigo en todo momento, gracias por existir.

Mi hermana Marisol, quien al alcanzar sus metas, me motivo a continuar buscando la mía.

Mis hermanos José, Elizabeth y Sophy, muchísimas gracias por apoyarme.

Mis sobrinos Rafael, William, Emmanuel y Sofía para que esto de sirva de guía y ejemplo.

Sayge Ortega, quien la vida no le alcanzó para acompañarme en este momento y regocijarnos juntas. Te tengo en mi corazón y mientras tenga vida te tendré presente.

Mis compañeros de carrera Oscarlina Rodríguez, Arturo Brito, Juan Carlos Vera, Ysmelia Castillo y Maria Mengual, quienes me enseñaron a reconocer el valor de la verdadera amistad.

AGRADECIMIENTO

A

Dios, quien guía mis pasos.

Mi asesora, MSc. Dina Antón, por su valiosa colaboración y su inmenso empeño en su asesoramiento por hacer posible la realización de este trabajo.

El Dr. Marcos de Donato, coordinador del laboratorio de Biología Molecular IBCA UDO y Hectorina Rudulfo, por apoyarme con su conocimiento en el aislamiento de plásmidos y, además, facilitarme sus espacios y equipos.

La profesora Militza Guzmán, por su apoyo en la realización de este trabajo.

El profesor Julio Armas, por brindarme su apoyo, consejos y enseñanzas.

Finalmente, aunque no menos importante mis compañeros de laboratorio María Victoria Figueras, Rosimir Cabeza, Olimar Marchan, Ángel Álvarez y Samia Small, por su colaboración y ayuda.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución porcentual de cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores, provenientes de 3 estaciones del agua del río Manzanares en el 2008.	13
Tabla 2. Frecuencia según la identificación bioquímica de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre.	16
Tabla 3. Frecuencia según la identificación bioquímica de cepas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre.	17
Tabla 4. Patrón fenotípico de susceptibilidad a betalactámicos en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de aguas del río Manzanares.	21
Tabla 5. Patrón fenotípico de susceptibilidad a betalactámicos en cepas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aisladas de aguas del río Manzanares.	23
Tabla 6. Bandas obtenidas de la extracción de plásmidos de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> resistentes a los betalactámicos probados.	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución porcentual de la susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a los betalactámicos ensayados. ATM: Aztreonam, CTX: 18	
Figura 2. Distribución porcentual de la susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a los betalactámicos ensayados. Aztreonam (ATM), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Piperacilina Tazobactam(TZP), Meropenem (MEM), Imipenem(IPM).	20
Figura 3. Perfil plasmídico de las cepas estudiadas en gel de agarosa al 0,8%. .25 A: Marcador molecular (1 Kb). 13 cepa de <i>Burkholderia cepacia</i> , 22,25,29,30,31,37,42 cepas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , 01,18,19,23,26,44,45 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25

RESUMEN

Se evaluó la detección de plásmidos en bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) resistente a betalactámicos, aislados de aguas del río Manzanares, del Estado Sucre, durante los meses febrero–junio de 2008. Cincuenta y cuatro aislados bacterianos fueron identificados por pruebas bioquímicas convencionales y se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana con el método de difusión con discos en agar Müller Hinton. Los plásmidos fueron aislados por el método de lisis alcalina y visualizados en gel de agarosa al 0,80%. En el presente estudio se identificaron 35 (65,81%) cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 22,22% cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* y 1,85% cepas de *Burkholderia cepacia*. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron resistencia a cefotaxima (68,60%); meropenem (57,19%), imipenem (22,89%), piperacilina tazobactam (42,81%) y aztreonam (42,81%); mientras que las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* mostraron resistencia a todos los antibióticos utilizados en este estudio. En *P. aeruginosa* se obtuvieron catorce fenotipos diferentes a través de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, sin embargo, para *S. maltophilia* se observó la presencia de cinco fenotipos diferentes. El aislamiento de los plásmidos se realizó en las cepas que mostraron resistencia a más de tres betalactámicos, de las cuales, siete fueron *P. aeruginosa*, siete *S. maltophilia* y una *B. cepacia*. En *P. aeruginosa* se observó la presencia de bandas plásmidicas que van desde 5,00 hasta $\geq 10,00$ Kb, aproximadamente. Las cepas de *S. maltophilia* mostraron bandas plásmidicas de alto peso molecular que van desde 3,00 hasta $\geq 10,00$ Kb aproximadamente

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos plantea una amenaza grave y creciente para la salud pública a nivel mundial, que involucra cada día nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia. Desde la aparición de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, no ha sido factible su total erradicación y el objetivo estratégico debe ser la contención para que se reduzca al mínimo la aparición y diseminación de los microorganismos resistentes y se realce al máximo el empleo eficaz de los antimicrobianos (Hisham y Finch, 2001).

Los medicamentos son de gran importancia en la prevención y combate de las enfermedades tanto de los humanos como de los animales, sin embargo, poco se sabe sobre su efecto potencial en el medio ambiente, debido a que luego de ser administrados, absorbidos, metabolizados y excretados, estos compuestos pueden llegar a los sistemas acuáticos por aportes directos de aguas residuales de origen doméstico, hospitalario, industrial, agropecuario o bien por los arrastres pluviales (Boxall, 2004). En estos ecosistemas, los antibióticos contribuyen al estrés bacteriano y al deterioro ambiental, además provocan un fuerte impacto negativo en la salud de los humanos, animales y plantas, afectando indiscriminadamente a la microbiota natural, alterando los ciclos biogeoquímicos en los cuales las bacterias son esenciales para que éstos se lleven a cabo (Kolpin *et al.*, 2002). Por otro lado, el incremento del uso de antibióticos en el sector agrícola e industrial, en la última década, ha generado un gran número de bacterias multirresistentes a ellos, lo que ha conllevado a la búsqueda de nuevos antibióticos (Cabello, 2004).

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos, que involucran la modificación enzimática del antibiótico, en la cual producen enzimas que son capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico,

haciendo que éste pierda su funcionabilidad; cambios en la permeabilidad de la membrana externa, donde la membrana bacteriana se ve alterada, principalmente, por cambios en las proteínas denominadas porinas; alteraciones del sitio blanco del antibiótico, en este mecanismo se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, alterándose el sitio de acción donde el antibiótico actúa sobre la bacteria para interrumpir una función vital de ésta; y la presencia de bombas de expulsión, éstas operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y lo expulsan al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este último mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Livermore, 1991; Vila *et al.*, 2007).

La adquisición y posterior diseminación de determinantes de resistencia antibiótica en bacterias patógenas representa un problema importante para el tratamiento de enfermedades (Calvo *et al.*, 2002). La presencia de la resistencia bacteriana se da por la expresión de genes cromosómicos, los cuales son naturalmente intrínsecos de la bacteria, y/o genes extracromosómicos, que son generalmente adquiridos a través de intercambio genético con otras bacterias por conjugación (plásmidos), transposición (transposones), transducción (bacteriófagos), o transformación (incorporación de fragmentos de ADN de una bacteria resistente a un antibiótico a otra bacteria) (Thompson, 1994; Davies y Welb, 1998; Keith *et al.*, 2000).

En los comienzos de la era de los antibióticos se consideraba a la mutación de genes la causa primaria de resistencia antimicrobiana, evidenciándose posteriormente que la transferencia horizontal de estos genes, por medio de plásmidos, es la principal causa en el desarrollo y diseminación de resistencia antibiótica en bacterias patógenas (Alonso *et al.*, 2001).

Los plásmidos son moléculas de ácido desoxiribonucleico (ADN)

extracromosómico, circular, dotados de replicación autónoma, es decir que no son necesarios para el crecimiento normal de la bacteria, éstos pueden tener distintos tamaños, dependiendo de los pares de bases que los conformen, y pueden aparecer en número variable. En general, los plásmidos más pequeños tienen un número elevado de copias y los plásmidos de gran tamaño se encuentran en número muy reducido, uno o dos (Mariscal *et al.*, 1981). Un gran número de características fenotípicas se relacionan con la presencia de plásmidos, como son la producción de toxinas, metabolismo de hidratos de carbono simples, producción de bacteriocinas, síntesis de enzimas intra o extracelulares o la resistencia a determinados antibióticos (Álvarez *et al.*, 1981). Los plásmidos de resistencia bacteriana han sido estudiados a nivel mundial por la multirresistencia que presentan algunas bacterias aisladas de muestras clínicas; se conoce muy poco sobre la prevalencia de plásmidos aislados del ambiente, sin embargo se piensa que la transferencia de plásmidos es responsable de la propagación de la resistencia a los antibióticos entre bacterias en el ambiente (Davey y Reaney, 1980, Ferrús *et al.*, 1999; Nikbin, *et al.*, 2007).

Los antibióticos más comunes, eficaces y menos costosos que se utilizan actualmente son los betalactámicos de amplio espectro, incluyendo las carbapenemas, cefalosporinas y penicilinas (Bush y Mobashery, 1998; Kotra y Mobashery, 1999). En respuesta a su uso generalizado, un número cada vez mayor de cepas bacterianas ha adquirido la capacidad de producir betalactamasas, enzimas que hidrolizan y hacen ineficaces a los betalactámicos (Eberhardt *et al.*, 2003).

Las carbapenemas han sido los antibióticos betalactámicos de mayor actividad, evadiendo la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana, y son antimicrobianos considerados dentro de la práctica clínica como la opción terapéutica en infecciones bacterianas severas causadas por organismos multirresistentes (Livermore, 2002). Estos compuestos son una clase de antibióticos betalactámicos, derivados de diferentes especies de *Streptomyces*, presentan una cadena trans-

hidroxietil en la posición 6 del anillo estructural betalactámico que le confiere gran estabilidad frente a las betalactamasas bacterianas. La primera carbapenema empleada en clínica fue el derivado de la tienamicina, denominado imipenem, que se formuló asociado a la cilastatina para impedir su hidrólisis por la deshidropeptidasa I renal humana (Gales *et al.*, 2003).

Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) son un grupo de microorganismos aerobios estrictos, que utilizan hidratos de carbono como fuente de energía, los cuales degradan a través de vías metabólicas diferentes a la fermentación (Becerra, 1993). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza: suelo, agua, mucosas y tracto digestivo del hombre y animales (Davies y Welb, 1998). En el grupo de los BGNNF existen especies de importancia clínica pertenecientes a los géneros *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Burkholderia* (Becerra, 1993; Castillo, 2000; Téllez *et al.*, 2000). Algunas especies de BGNNF a menudo presentan resistencia natural o intrínseca a múltiples antimicrobianos, incluyendo a los betalactámicos (Fass *et al.*, 1996).

En países como México, España, Estados Unidos y Venezuela se han realizado estudios sobre resistencia bacteriana en el ambiente y los agentes que contribuyen a su aumento, entre ellos podemos mencionar el aumento de la población, el uso inadecuado y excesivo de los antibióticos, la contaminación ambiental, entre otros (Goñi-Urriza *et al.*, 2000; Ash *et al.*, 2002; Correa-Basurto *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2008). Esta situación ha llevado a elaborar programas de vigilancia de la resistencia bacteriana regional y local. En la Comunidad Europea y América uno de los programas involucra a la Organización Mundial de la salud y se le denominó Programa de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana WHONET. En Venezuela se le denomina Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana (GVRB), que funciona desde 1988 (Carmona *et al.*, 1992; Stelling y O'Brien, 1997).

En el estado Sucre una de las fuentes de agua de vital importancia es el río Manzanares, en especial para los centros poblados ubicados en sus márgenes, los cuales desarrollan diferentes actividades agropecuarias, industriales, de esparcimiento y vivienda; actividades que se han incrementado considerablemente en los últimos años. El río recibe las aguas residuales de todas estas actividades con mínimo o ningún tratamiento (Martínez *et al.*, 2001). Senior *et al.* (2004) realizaron estudios bacteriológicos en las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, donde evidenciaron la presencia de coliformes totales y fecales como indicadores de contaminación fecal del agua, sin embargo no señalan la presencia de BGNNF.

González, en el 2010, en un estudio realizado en muestras de sedimento proveniente de los márgenes del río Manzanares, aisló BGNNF de interés clínico como *Pseudomonas aeruginosa*.

Los BGNNF juegan un papel importante en la propagación de la resistencia y a su capacidad para transferirla a microorganismos patógenos del humano; por este motivo en el presente trabajo se planteó como objetivo, detectar la presencia de plásmidos en cepas de BGNNF resistente a betalactámicos aisladas de aguas del río Manzanares, con la finalidad de aportar datos que permitan contribuir a la prevención de enfermedades adquiridas por el uso de aguas contaminadas.

METODOLOGIA

Población y muestra

Para este estudio se utilizaron 54 cepas de BGNNF aisladas de un muestreo realizado durante los meses febrero-junio de 2008, de tres estaciones de aguas del río Manzanares, identificadas como La Fragua (E₁), Los Dos Ríos (E₂), y mercado municipal de Cumaná (E₃); las cuales se encuentran preservadas en medio conservación, a temperatura ambiente, en el laboratorio de investigación Bacteriológica del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente.

Viabilidad de las cepas

Previo a la caracterización de las cepas bacterianas, se procedió a verificar su pureza y viabilidad mediante la siembra en agar nutritivo, agar sangre y agar McConkey.

Análisis bacteriológico

Éste se llevó a cabo siguiendo los procedimientos y esquemas de diagnóstico establecidos para el aislamiento e identificación de bacterias Gram negativas no fermentadoras de glucosa (Koneman *et al.*, 2008)

Se tomaron las colonias a partir de los cultivos puros, se procedió a realizar la caracterización morfológica de las mismas, tales como tamaño, forma, aspecto, olor, color, las cuales orientan hacia el grupo de las bacterias en estudio, y se realizó la tinción de Gram, para la descripción de la morfología celular y su coloración, que orientó hacia el género en estudio.

Identificación bioquímica de los microorganismos

Carácter no fermentador:

Se tomó un inóculo de las colonias viables del agar McConkey, y se sembró en agar Kligler, para demostrar el carácter no fermentador de azúcares, mediante la técnica de punción y estrías, el cual se incubó a 35°C por 24 - 48 horas. La no fermentación de los azúcares se verificó por la ausencia de cambio de color del indicador.

Los aislados que resultaron no fermentadores de azúcares fueron caracterizados fenotípicamente, mediante pruebas bioquímicas convencionales, a través de una galería bioquímica primaria para la determinación de la familia y una secundaria para diferenciación de especies (Koneman *et al.*, 2008).

Oxidasa

La producción de la enzima citocromo oxidasa es una prueba que permitió diferenciar familias de bacterias pertenecientes al grupo de los BGNNF. Se tomó con un palillo de madera una colonia procedente del agar nutritivo y se colocó sobre un trozo de papel de filtro previamente impregnado con el reactivo tetrametil p-fenilendiamina. La ausencia de color en el lugar donde se colocó la colonia indicó una reacción negativa y la presencia de color púrpura evidenció que se trata de bacterias oxidasa positiva, sugestiva de una especie Gram negativa.

Agar motilidad

Se realizó mediante la siembra por punción en agar motilidad con sal de tetrazolium (TTC) al 1,00%, donde se evidenció la positividad mediante la presencia de una turbiedad rosada que difundió por todo el medio, y la negatividad de la prueba

(sin motilidad) por la producción de una línea roja brillante limitada en la línea de siembra, en el cual se mantuvo el medio claro alrededor.

Oxidación de azúcares

Esta reacción demuestra la vía de utilización de los carbohidratos por parte de las bacterias, la cual puede ser oxidativa, fermentativa o ambas. La oxidación de los azúcares glucosa, manitol y maltosa se evidenció mediante la inoculación en tubos que contengan medio basal oxidación-fermentación 1,00% de carbohidratos. Se inoculó por punción dos tubos por cada cepa, para cada carbohidrato utilizado, de los cuales uno se cubrió con aproximadamente 1,00 ml de parafina líquida estéril, y se incubó por 24 - 48 horas. La reacción se evidenció por un cambio de viraje del indicador de verde a amarillo, por la presencia de ácido, en la parte superior del medio inoculado (Koneman *et al.*, 2008).

Crecimiento a 42^oC

Constituyó una prueba diferencial entre las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y más específicamente entre especies del grupo fluorescente, donde se verificó la capacidad de las bacterias de crecer a altas temperaturas. Esta se realizó por medio de la siembra de las cepas de interés en agar LB, posteriormente, se incubaron a 42^oC, durante 24 - 48 horas.

Descarboxilación de lisina

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas sustrato específicas, capaces de reaccionar con la porción carboxilo de los aminoácidos, formando aminas de reacción alcalina. Las bacterias que tuvieron la capacidad de producir la enzima lisina

descarboxilasa fueron capaces de remover la molécula de CO₂ del aminoácido lisina para formar aminas (cadaverina). El medio Müller fue la base que se emplea para determinar la capacidad de descarboxilación de las bacterias, éste fue inoculado con el microorganismo a estudiar, luego se cubrió con, aproximadamente, 1 ml de parafina líquida y se incubó a 35°C por 24- 48 horas. La aparición de un color púrpura en el medio indica que la prueba fue positiva.

Hidrólisis de la arginina

La conversión de la arginina en citrulina fue más una reacción de hidrólisis que descarboxilación, en la cual un grupo amino fue removido de la arginina para formar citrulina que es convertida en ornitina, la que se descarboxiló para formar putrescina. Se inoculó el medio arginina con el microorganismo estudiado, posteriormente, fue sellado con parafina líquida para proporcionar las condiciones de anaerobiosis y controlar el pH del medio y se incubaron a 35°C por 24 - 48 horas, la positividad de la prueba se evidenció al observarse el color púrpura en el medio y la negatividad por la presencia de un color amarillo.

Hidrólisis de esculina

Esta prueba se realizó inoculando el microorganismo por estrías en medio esculina, el cual se incubó a 35°C de 24 - 48 horas. La esculina es un medio que fluoresce al incidir la luz ultravioleta a través de una lámpara de Wood, cuando la esculina se hidroliza el medio se tornará negro rojizo y desaparece la fluorescencia, esto es indicativo que ocurre una reacción positiva.

Licuefacción de la gelatina

Se basó en la producción de la enzima gelatinasa, la cual hidrolizó la gelatina,

formando un precipitado alrededor de la colonia. Para ello, se inoculó el medio gelatina con la suspensión bacteriana formando una línea en el medio, se incubó a 35°C por 24 - 48 horas. La prueba fue positiva al formarse alrededor del crecimiento una zona opaca.

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó por el método de difusión en agar Müller Hinton, descrito por Bauer *et al.* (1966), siguiendo los lineamientos del Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, 2009).

Se suspendieron de 3 a 5 colonias del microorganismo de interés, provenientes del agar McConkey, en 4,5 ml de solución salina fisiológica, ajustando al patrón 0.5 de Mc Farland. Posteriormente, se realizó la siembra de la suspensión de bacterias en el agar Müller Hinton con la ayuda de un hisopo de algodón, impregnado con la suspensión y se diseminó en la superficie del agar. Se procedió a colocar los discos de antibióticos con la ayuda de una pinza y haciendo un poco presión. Los antibióticos utilizados fueron los siguientes: aztreonam (30 µg), cefotaxima (100 µg), ceftazidima (30 µg), piperacilina tazobactam (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg). Paralelamente, se realizó un control de calidad donde se utilizó una cepa certificada de *P. aeruginosa* ATCC 27856, y una de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Aislamiento de plásmidos

Este método es una modificación del descrito por Birboin y Doly, 1979 y se empleó para aislar ADN plásmidico de manera rápida y en suficiente cantidad.

Las cepas de los bacilos BGNNF que mostraron resistencia a antibióticos

betalactámicos fueron cultivadas en 20 ml de caldo LB con ampicilina (16 µg/ml) por 18 horas a 35°C, con agitación. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 5000 g por 5 minutos y se descartó todo el sobrenadante. Se suspendió el sedimento con 200 µl de solución estabilizante (50 mmol.10⁻¹ glucosa; 25mmol.10⁻¹Tris-HCl; pH 8; 10 mmol.10⁻¹EDTA; pH 8) con agitación suave, luego se agregaron 10 µl ARNasa (10 mg/ml) y se dejó 10 minutos en hielo, seguidamente, se añadieron 400 µl de solución lisis (SDS: NaOH 1:1) se mezcló el tubo por inversión suave y se incubó en hielo por 5 minutos (tratando de no exceder el tiempo). Posteriormente, se agregaron 300 µl de solución neutralizante (acetato de potasio 3 mmol, 10⁻¹ pH 4,8) previamente enfriado (en congelador), mezclándose por inversión e incubándose en hielo por 5 a 8 minutos. Se centrifugó la suspensión por 20 minutos a 14 000 g a 4°C. Se tomó la parte superior de la mezcla sin tocar la interfase y se colocó en un nuevo tubo eppendorf y se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando por 5 minutos. Se centrifugó la suspensión por 5 minutos a 14 000 g a 4°C, se agregó el sobrenadante en un tubo eppendorf y se añadió 700 µl de isopropanol, mezclando suavemente y dejando en hielo 10 minutos. Se centrifugó a 14 000 g por 15 minutos a 4°C eliminando luego el sobrenadante. Finalmente, se lavó el sedimento o pellet con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó por 10 minutos 14 000 g, se eliminó el etanol y se dejó secar en la estufa. El pellet que contiene el ADN plásmidico se resuspendió en 20 µl de buffer TE hasta el momento de su uso (Birboin y Doly, 1979).

Visualización de moléculas plasmídicas

Los plásmidos extraídos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE 0,5X (45 mM Tris, 45 mM de ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8,3); para preparar el gel de agarosa se añadieron 3 µl de solución de bromuro de etidio 10 mg/ml. Luego de preparado y solidificado el gel, se colocó en una cámara de electroforesis (sistema de gel electroforética, EC 330, Midicell Primo), la cual

contuvo la solución amortiguadora usada para preparar el gel. A cada uno de los aislamientos plasmídicos analizados se le colocó, aproximadamente, 1 μ l de colorante de electroforesis y se mezcló suavemente. Con una micropipeta automática se colocaron 4 μ l del ADN plásmidico en cada uno de los pozos del gel. En el primer pozo se colocó un marcador de ADN de Lambda 1Kb (promega). Para la corrida se aplicó una corriente de 80 V a una temperatura de 4°C por hora y media, se sacó el gel de agarosa, se colocó en un transiluminador UV High performace para observar las bandas de ADN separadas, las mismas fueron fotografiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los BGNNF identificadas en el presente estudio, el mayor predominio correspondió a *Pseudomonas aeruginosa* (65,81%), seguida de *Stenotrophomonas maltophilia* (22,22%) (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución porcentual de cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores, provenientes de 3 estaciones del agua del río Manzanares en el 2008.

Microorganismo	N° de cepas por estaciones			Total	%
	E ₁	E ₂	E ₃		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	4	28	35	65,81
<i>P. stutzeri</i>	2	0	0	2	3,70
<i>P. mendocina</i>	1	0	0	1	1,85
<i>P. orryzinhabitans</i>	1	0	0	1	1,85
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	0	0	12	12	22,22
<i>Sphingomonas</i> sp	0	2	0	2	3,70
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	1	0	0	1	1,85
Total	8	6	40	54	100,00

E: estación. E₁: La Fragua, E₂: Los Dos Río y E₃: mercado municipal de Cumaná.

El mayor número de cepas aisladas se encontró en la estación 3, que corresponde al mercado municipal, ubicado en la desembocadura del río Manzanares, donde a diario se desechan gran cantidad de sólidos y líquidos, desechos industriales y combustible de pequeñas embarcaciones, que contribuyen al aumento de la flora bacteriana.

En la cuenca del río Manzanares, son escasas las investigaciones realizadas para determinar la carga de microorganismos heterotróficos. Al respecto, Fernández (1984), en un estudio realizado en aguas superficiales de los ríos Manzanares y Guasdua del estado Sucre, Venezuela, reportó índices alarmantes de contaminación,

especialmente de origen bacteriano, logrando identificar especies patógenas como *Salmonella* sp. *Escherichia coli* y *Vibrio* sp.

Gutiérrez (2005), en investigaciones realizadas sobre las aguas del río Manzanares, en muestra recolectadas durante los periodos de sequía y lluvia en las cuencas alta y media, reportó valores que van desde $2,20 \times 10^2$ hasta $2,40 \times 10^6$ coliformes totales/100ml de agua; valores de 0 hasta $4,30 \times 10^6$ coliformes fecales/100 ml de agua y 0 a $1,30 \times 10^5$ *Clostridium*/100 ml de agua, demostrándose su presencia en todas las estaciones de muestreo, incrementándose en el periodo de lluvia, en estos estudios no se han aislados BGNNF de interés clínico como *Pseudomas*, *S. maltophilia* y *Acinetobacter*.

Los ríos representan una de las principales fuentes de aguas para el consumo humano y animal, la corriente de los mismos puede contribuir a mantener e incluso diseminar elementos de resistencia bacteriana (Goñi-Urriza, *et al.*, 2000). Al respecto *P. aeruginosa* es una bacteria que no se considera autóctona del agua, puede derivar de heces humanas y animales, y su detección en agua se asocia con contaminación por descarga de aguas residuales, por lo tanto, hay una estrecha correlación de su presencia en ambientes acuáticos con fenómenos de contaminación (De Vicente, *et al.*, 1991). Además, *P. aeruginosa* es una bacteria oportunista y es la causante de un amplia variedad de infecciones, especialmente, de oídos, ojos y piel, su control en aguas destinadas a la recreación es obligación en varios países del mundo (Moore *et al.*, 2002). Esto se debe a que posee resistencia intrínseca a múltiples antibióticos y a una extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia por mutaciones (Pollack, 1997).

S. maltophilia ha sido aislada de sistemas acuíferos potencialmente

contaminados con herbicidas, y derivados del petróleo ampliamente usados como gasolina, kerosene y diesel, contaminantes comunes del ambiente. En Venezuela no se han reportado estudios realizados que informe sobre el aislamiento de *S. maltophilia* en agua, sin embargo, ha sido aislada de fuentes y ambientes hospitalarios, siendo señalada como un importante patógeno oportunista, causante principalmente de bacteremia, y procesos respiratorios (Araque *et al.*, 2001; Antón *et al.*, 2005). Además, presenta resistencia a distintos agentes antimicrobianos por poseer una bomba de eflujo (SmeDEF) que elimina hacia el exterior de la bacteria un gran número de sustancias (Alonso *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2005). Sin embargo, el mecanismo más importante que contribuye al desarrollo de la resistencia a los betalactámicos en *S. maltophilia*, es la presencia de betalactamasas, que se pueden encontrar codificadas por plásmidos, los cuales pueden provocar una transmisión horizontal de la resistencia (Paton *et al.*, 1994).

De las 35 cepas identificadas como *P. aeruginosa*, se observó un comportamiento uniforme para casi todas las pruebas con pocas variaciones según el esquema establecido por Koneman *et al.* (2008) (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia según la identificación bioquímica de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre.

Prueba	Resultados Esperados	N	%
Kliger Alc/Alc	+	35	100,00
Oxidasa	+	35	100,00
Motilidad	+	35	100,00
OF Glucosa	+	35	100,00
OF Maltosa	-	32	91,43
OF Manitol	+	21	60,00
Esculina	-	18	51,43
Crecimiento 42°C	+	35	100,00
Lisina	-	33	94,28
Arginina	+	33	94,28
Gelatina al 4%	+	35	100,00
Polimixina B	S	35	100,00

N: Número de cepas; OF: oxidación/fermentación.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la identificación bioquímica de *S. maltophilia*, los cuales mostraron un patrón constante al establecido por Koneman *et al.* (2008) para la identificación de BGNMF, sin embargo, se hallaron algunas cepas con modificaciones en el patrón; en el caso de oxidasa nueve cepas fueron negativas y tres resultaron positivas, lo que sugiere que hay que considerar las cepas oxidasa positivas, con las características morfológicas de la colonia. En cuanto a la maltosa, nueve cepas resultaron positivas y en manitol, diez fueron negativas. En la prueba de esculina, once cepas dieron resultados positivas y diez resultaron negativas a arginina.

Tabla 3. Frecuencia según la identificación bioquímica de cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de aguas del río Manzanares. Cumaná, estado Sucre.

Prueba	Resultados Esperados	N	%
Kliger Alc/Alc	+	12	100,00
Oxidasa	-	9	75,00
Motilidad	+	12	100,00
OF Glucosa	+	12	100,00
OF Maltosa	+	9	75,00
OF Manitol	-	10	83,33
Esculina	+	11	91,67
Crecimiento 42°C	+	12	100,00
Lisina	+	12	100,00
Arginina	-	10	83,33
Gelatina al 4%	+	12	100,00
Polimixina B	S	12	100,00

N: Número de cepas; OF: Oxidación/ fermentación.

En la figura 1 se muestra la susceptibilidad *in vitro* de *P. aeruginosa* a betalactámicos. Dada la inexistencia de un manual para muestras ambientales, se tomó como referencia el CLSI (2009), el cual se emplea para la susceptibilidad antimicrobiana en muestras clínicas. Los resultados de la prueba muestran resistencia a cefotaxima (78,28%), meropenem (57,14%), imipenem (22,86%), piperacilina tazobactam (42,85%), y aztreonam (48,58%).

El porcentaje de resistencia a IPM (22%) es comparable con lo reportado por Livermore (2002), quien indicó que a nivel mundial se ha informado una emergencia en la resistencia de *P. aeruginosa* a IPM que va de 10 a 25%.

Por su parte, Lösch *et al.* (2005) determinaron la susceptibilidad en cepas de *P. aeruginosa* de origen ambiental, encontrando cepas sensibles a las carbapenemas (97,80%) y a Ceftazidima (100%), estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio, donde se observaron altos porcentajes de sensibilidad a IMP y CAZ.

La resistencia a los antibióticos ha sido relacionada con el uso inadecuado de los mismos, mucho de estos son empleados en la agricultura y la industria. Este problema comienza a ser alarmante porque los antibióticos, no metabolizados, pasan directo al ambiente, donde entran en contacto con las poblaciones microbianas, haciéndolas resistentes a los mismos, pero lo realmente preocupante es cuando esta resistencia es adquirida en bacteria patógena, convirtiéndose en un problema no tan solo de contaminación de agua, sino de salud ambiental (Lenski, 1998; Kümmerer, 2004; Kapil, 2005).

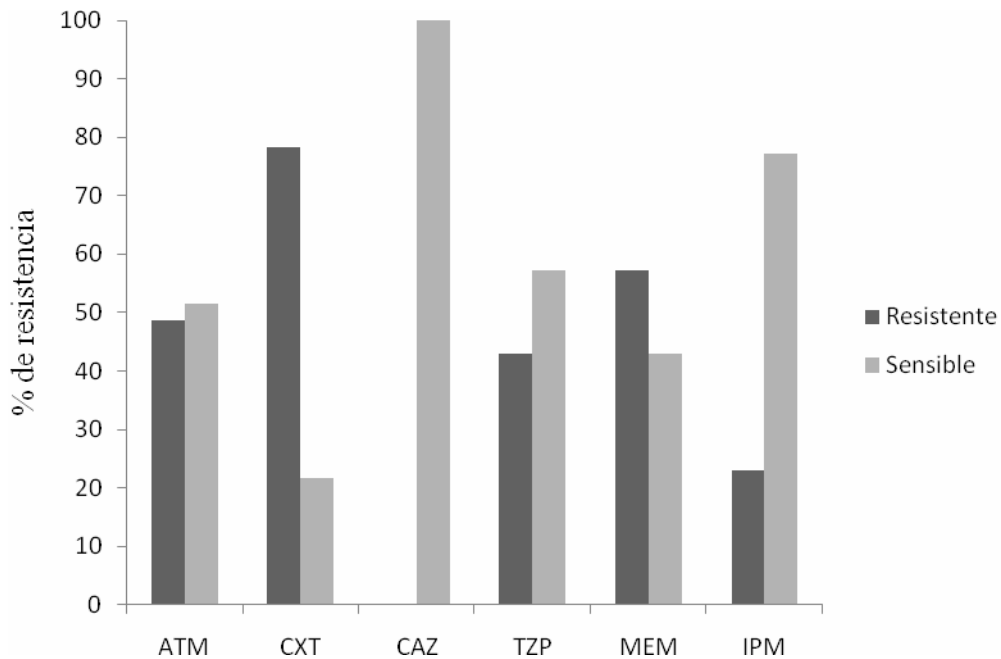


Figura 1. Distribución porcentual de la susceptibilidad in vitro de *Pseudomonas aeruginosa* a los betalactámicos ensayados. ATM: Aztreonam, CXT:

Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, TZP: Piperacilina Tazobactam, MEM: Meropenem y IPM: Imipenem.

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los reportados por Correa-Basurto *et al.* (2007), quienes en un estudio realizado en México sobre aislamiento de bacterias heterótrofas del lago de los reyes aztecas, reportaron un porcentaje de resistencia de 19,00% a CXT y 20,00% a ceftriaxone

Pitout *et al.*, (1997) y Arias, *et al.* (2000) demostraron que la resistencia a los betalactámicos va en aumento gracias a la capacidad para producir betalactamasas.

Durante los últimos 50 años, se han incrementado las publicaciones sobre los efectos a largo plazo que los antibióticos y pesticidas tienen en la salud humana y el ambiente, y las aguas de los ríos son los mayores receptores de estos contaminantes (Guardabassi *et al.*, 1998, Giger *et al.*, 2003, Juárez-Figueroa *et al.*, 2003 y Amin *et al.*, 2004).

La resistencia de los microorganismos a las carbapenemas constituye una amenaza para los pacientes y las instituciones de la salud, ya que por muchos años han sido los antibióticos más estables y activos contra bacterias con resistencia múltiple. En el caso de *P. aeruginosa* existe una mayor prevalencia de resistencia a las carbapenemas, ya que esta bacteria posee múltiples mecanismos de resistencia que comprometen, no sólo a las carbapenemas sino a todos los demás antibióticos disponibles. Esta resistencia está dada por la combinación, al menos, de dos mecanismos simultáneos de resistencia, el cierre de porinas junto con la producción de betalactamasa (Suárez, *et al.*, 2006).

En la figura 2, se presentan los resultados de las pruebas de susceptibilidad a betalactámicos, en cepas de *S. maltophilia*, observándose resistencia a IPM (100%), ATM (91,66%), CTX (100,00%), MEM (83,33%), TZP (66,66%) y CAZ (33,33%).

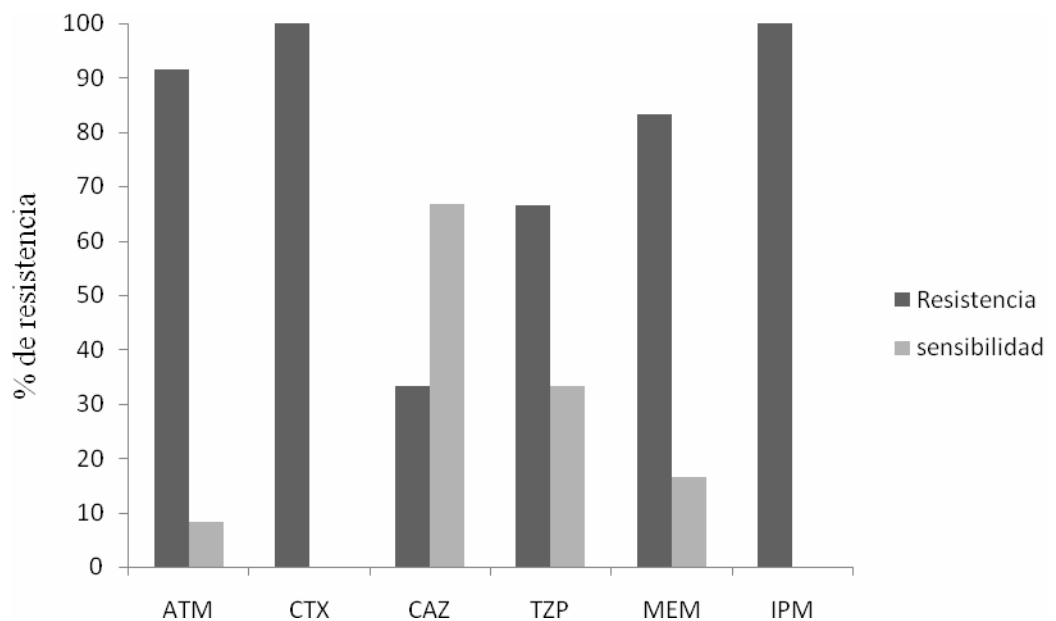


Figura 2. Distribución porcentual de la susceptibilidad *in vitro* de *Stenotrophomonas maltophilia* a los betalactámicos ensayados. Aztreonam (ATM), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Piperacilina Tazobactam(TZP), Meropenem (MEM), Imipenem(IPM).

Estos resultados son comparables con los reportados por Antón *et al.*, 2005 en un estudio realizado en ambientes intrahospitalarias donde señalan resistencia a IPM, ATM (100%), a CTX (95,83%) y a TZP (75,00%), betalactámicos. Por su parte, Vay *et al.* (2005), en un estudio realizado en cepas de diferentes géneros y/o especies de BGNNF aisladas, durante el período 1994-2002, en el Hospital Clínico José de San Martín de Buenos Aires, Argentina, encontraron que cepas *S. maltophilia* presentaron resistencia betalactámicos.

Esta bacteria presenta un perfil cromosómico que es responsable del fenotipo resistente a IMP, cefalosporinas tradicionales y a la mayoría de los carbapenemas (Livermore, 2002).

En el análisis de los resultados obtenidos se diferenciaron catorce fenotipos entre las cepas de *P. aeruginosa*, los cuales se designaron de manera arbitraria con números romanos (I hasta XIV), siendo el más frecuente el fenotipo I, con nueve aislados (25,71%), seguido de los fenotipos II y III, ambos con cuatro aislados (11,40%) (Tabla 4). Las cepas que presentaron el fenotipo I (9 cepas) se caracterizaron por ser sensible a cinco de los betalactámicos ensayados y resistentes a CTX. Sin embargo, cabe resaltar que los fenotipos restantes presentaron un patrón variable en cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana, observándose fenotipos con un patrón de resistencia, al menos, a tres betalactámicos.

Estos resultados son comparables a los publicados por, González (2010), en un estudio realizado en aislados de *P. aeruginosa* en aguas del río Manzanares, quien reportó siete fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana, siendo el más frecuente el fenotipo II con seis aislados, presentando sensibilidad a los antibióticos CAZ, ATM, MEM, IPM, TZP, PIP, CIP, GM, NN. Con estos resultados se detecta que el 74,29% de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del río Manzanares son resistente a los betalactámicos más potentes, la cual genera preocupación; ya que este tipo de antimicrobianos constituye la primera línea de elección, para el tratamiento de infecciones graves producidas por bacterias Gram negativas incluyendo *P.aeruginosa*, principalmente, las que son de origen nosocomial. En otras palabras, la presencia de *P. aeruginosa* resistente a betalactámicos en aguas del río Manzanares constituyen un riesgo para las personas propensas a adquirir infección, que tengan contacto con estas aguas.

En la tabla 5 se observa el patrón fenotípico de susceptibilidad en cepas de *S.maltophilia*, designados de manera arbitraria con letras (A – E), siendo A y B los fenotipos más frecuentes con cuatro aislados (33,3%) cada uno, los cuales presentaron un patrón de resistencia muy similar, la diferencia estuvo en la

sensibilidad a CAZ por parte de las cepas del fenotipo B. Por otro lado, todos los fenotipos mostraron a las carbapenemas.

Tabla 4. Patrón fenotípico de susceptibilidad a betalactámicos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas del río Manzanares.

Fenotipo	N	Resistente	Sensible
I	9	CTX	ATM; TZP; CAZ;MEM;IPM
II	4	CTX; ATM; TPZ	CAZ;MEM;IPM
III	4	TZP;ATM ;MEM	CXT; CAZ, IPM
IV	3	CTX;ATM; MEM,IPM	TZP, CAZ
V	2	CTX;TZP;MEM	ATM ;CAZ;IPM
VI	2	CTX;MEM;IPM	ATM;CAZ;TZP
VII	2	CTX; ATM;MEM	TZP;CAZ; IPM
VIII	2	ATM;MEM	CTX; TZP; CAZ;IPM
IX	2	MEM	CTX; TZP; ATM, CAZ;IPM
X	1	CTX;TZP;ATM; MEM	CAZ; IPM
XI	1	CTX;TZP;IPM	ATM;CAZ;MEM
XII	1	TZP;MEM;IPM	CTX; ATM;CAZ
XIII	1	CTX;TZP;MEM	ATM;CAZ;IPM
XIV	1	CTX;TPZ;ATM; IPM	CAZ;MEM

N: Número de cepas; ATM: Aztreonam; CTX: Cefotaxima; TZP: Piperacilina Tazobactam; CAZ: Ceftazidima; MEM: Meropenem; IP M: imipenem.

En la tabla 5 se observa el patrón fenotípico de susceptibilidad en cepas de *S. maltophilia*, siendo el más frecuente el fenotipo A con cuatro aislados (33,3%), el fenotipo B con cuatro (33,3%) y el fenotipo C con dos (16,70%).

Tabla 5. Patrón fenotípico de susceptibilidad a betalactámicos en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de aguas del río Manzanares.

Fenotipo	N	Resistente	Sensible
A	4	ATM;CTX;TZP;MEM;IPM,CAZ	-
B	4	ATM;CTX;TZP;MEM;IPM	CAZ
C	2	ATM;CTX;IPM;MEM	CAZ;TZP
D	1	CTX;IPM	CAZ ;ATM; TZP;MEM
E	1	ATM;CTX;IPM	CAZ;TZP;MEM

N: Número de cepas; ATM: Aztreonam; CTX: Cefotaxima; TZP: Piperacilina Tazobactam; CAZ: Ceftazidima; MEM: Meropenem; IPM: imipene.

Avison *et al.* (2001) señala que *S. maltophilia* presenta una resistencia intrínseca a los betalactámicos, sin embargo las cepas evaluadas mostraron variaciones en los patrones fenotípicos obtenidos en este estudio, lo cual puede deberse, a que la susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión del disco en agar y no por CMI como lo recomienda el CLSI.

Poco se sabe sobre los fenotipos de susceptibilidad de *S. maltophilia* aisladas de agua de río. Sin embargo, los datos obtenidos en esta investigación pueden ser comparados con los encontrados por Antón (2006), quien realizó un estudio en cepas de, *S. maltophilia*, pero provenientes de muestras de pacientes atendidos en una unidad de cuidados críticos, reportando que el fenotipo más frecuente (patrón I) fue el que mostró resistencia a los antimicrobianos ATM, CTX, TZP, CAZ, IPM. Esto podría estar indicando que cepas de *S. maltophilia* aisladas de pacientes hospitalizados además se encuentran en el ambiente, lo cual también llena de preocupación, por lo que se haría necesario realizar estudios que se aboquen a comparar las características de este microorganismo aislados de ambos ambientes.

En la tabla 6 se muestran las bandas plasmídicas de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y *B. cepacia* de las cepas resistentes a los betalactámicos ensayados.

Tabla 6. Bandas obtenidas de la extracción de plásmidos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* resistentes a los betalactámicos probados.

Número de muestra	Cuenca	Número de bandas	Valor aproximado de Kb
<i>P. a</i> 23	3	1	1: $\geq 10,00$
<i>P. a</i> 26	3	2	1: 5,00; 1: $\geq 10,00$
<i>P. a</i> 45	3	4	3: $\geq 10,00$; 1: 8,00
<i>S. m</i> 22	3	3	2: $\geq 10,00$; 1: 8,00
<i>S. m</i> 25	3	6	3: $\geq 10,00$; 1: 8,00; 1: 4,00; 1: 2,00
<i>S. m</i> 29	3	2	1: $\geq 8,00$; 1: $\geq 10,00$
<i>S. m</i> 31	3	1	1: $\geq 8,00$
<i>S. m</i> 37	3	1	1: $\geq 10,00$
<i>B. c</i> 013	2	2	1: 4,00; 1: $\geq 10,00$

P. a: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. m*: *Stenotrophomonas maltophilia* y *B. c* *Burkholderia cepacia*.

En las cepas de *P. aeruginosa*, se observó la presencia de banda plasmídica solamente en las muestras 23, 26 y 45 que van desde 5,00 hasta $\geq 10,00$ Kb, aproximadamente, en las cepas restantes no se evidenció la presencia de estas bandas, sin embargo no se puede asegurar que las mismas carecen de plásmidos. Es de hacer notar que las cepas que albergan plásmidos resultaron resistentes a, por lo menos, tres betalactámicos, por lo que sería interesante establecer, en estudios posteriores, la relación que pudiera existir entre dicha resistencia y los plásmidos. En las cepas de *S. maltophilia*, 22, 25, 29, 31, y 37, se evidenciaron bandas plasmídicas de alto peso molecular que van desde 3,00 hasta $\geq 10,00$ Kb, aproximadamente, y en la cepa de *B.*

cepacia correspondiente a la estación 1, se evidenció la presencia de 2 bandas plasmídicas de 4,00 y $\geq 10,00$ Kb, aproximadamente. Como se puede observar, en ninguna de las cepas que presentaron plásmidos se distingue un patrón de bandas similares, la cual hace pensar que se podría tratar de cepas no relacionada entre sí por la que se hace necesario realizar otros ensayos que permitan caracterizar los plásmidos aislados en el presente estudio, la cual no fue objeto de esta investigación (Figura 3)

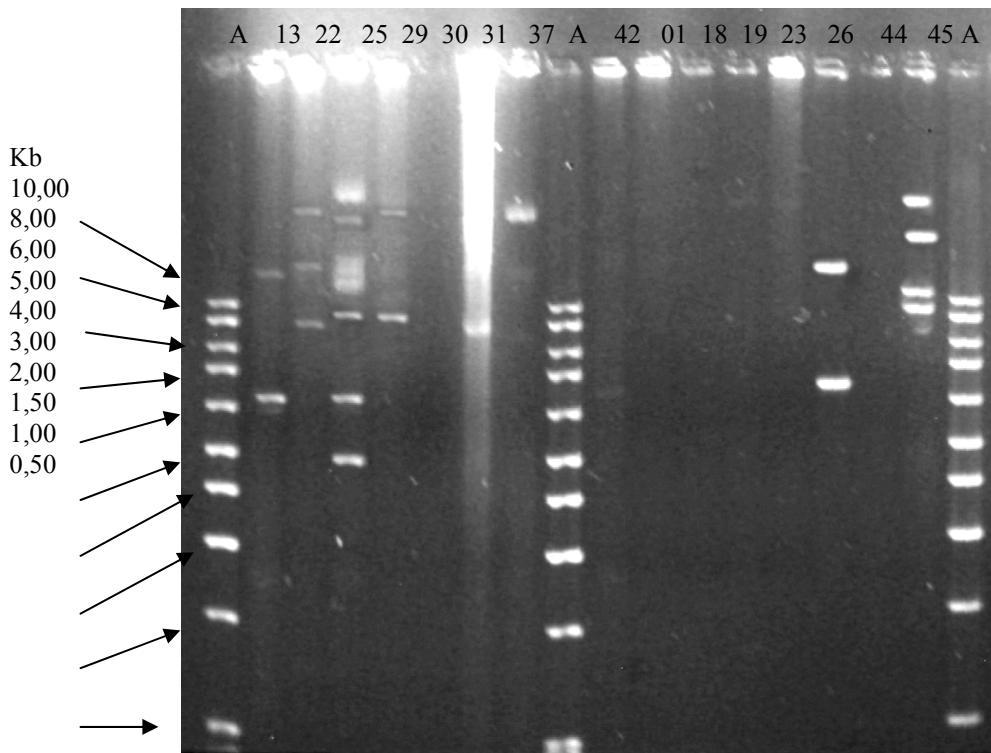


Figura 3. Perfil plasmídico de las cepas estudiadas en gel de agarosa al 0,8%.
A: Marcador molecular (1 Kb). 13 cepa de *Burkholderia cepacia*, 22,25,29,30,31,37,42 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, 01,18,19,23,26,44,45 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se ha reportado una relación entre el grado de contaminación de aguas y la prevalencia de *P. aeruginosa*. Al respecto Pirnay *et al.* (2005) reportó en Bélgica, que esta bacteria prolifera mejor en ambientes contaminados con petróleo, pero es mal competidor en ambientes no alterado por el hombre; crece y es capaz de proliferarse

rápidamente cuando los nutrientes estén disponibles o las condiciones sean favorables.

Tanto en la ganadería como en acuicultura, el uso profiláctico de antibióticos puede ser reemplazado por medidas de higiene, sin repercusiones para la salud animal y la economía de la industria, demostrando que este uso es innecesario y totalmente prescindible (Dowling, 2000; Gorbach, 2001 y Sorum *et al.*, 2002). Así mismo, el uso de agentes antimicrobianos en acuicultura ha seleccionado bacterias resistentes en los ecosistemas expuestos, dicha resistencia puede diseminarse entre bacterias. Además existe evidencia epidemiológicas y moleculares que señalan que los genes que median la resistencia pueden ser transmitidos entre bacterias, la cual las condiciona para producir infecciones en humanos y en animales terrestres (Angulo, 2000; Cabello, 2004; Amin *et al.*, 2004; Lösch *et al.*, 2005). Esto indica que los comportamientos acuáticos y terrestres carecen de fronteras respecto del flujo de genes de resistencia a antibióticos (Aguero *et al.*, 1984) y también que el fenómeno de resistencia es global, ya que el uso de antibióticos en un ambiente tendrá, a lo largo del tiempo, repercusiones en otros ambientes aparentemente lejanos. Esta resistencia se manifiesta con el mero uso de antimicrobianos, pero claramente se acelera e intensifica con el abuso de antibióticos, cuando se exponen bacterias a estos agentes en forma innecesaria, prolongadamente o en dosis subterapéuticas, con lo que se desencadenan los mecanismos genéticos inductores de resistencia y se traspasan estas propiedades entre las bacterias.

Un estudio realizado por Bastl *et al.* (1988) explica que el uso rutinario de antibióticos en la acuicultura, con el objeto de resolver problemas de enfermedades infecciosas en las granjas, ha resultado en un incremento de la presencia de plásmidos que confieren resistencia en diferentes bacterias patógenas.

P. aeruginosa es el microorganismos más utilizado y estudiado en la biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre la xenobiótica, pero también es conocido por ser patógeno oportunista en humanos y responsable de complicaciones graves en personas inmunosuprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística, existe mucho interés en el estudio de las relaciones filogenéticas entre aislados clínicos y ambientales (Rockne *et al.*, 2000). Esta bacteria tiene la capacidad de sintetizar ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados cuando se encuentra en la fase estacionaria de su crecimiento, esto solo se puede realizar en la primera fase del proceso de biorremediación, contribuyendo así con la movilización y solubilización de los contaminantes durante la fase siguiente de mineralización (Demaneche *et al.*, 2001). Las condiciones de contaminación que presenta la estación del mercado favorecen la presencia de *P. aeruginosa* en esta estación.

Las cepas de *S. maltophilia* presentaron un gran número de bandas plasmídicas, El fenotipo de resistencia a betalactámicos en este microorganismo, fundamentalmente es de carácter intrínseco, lo cual se debe principalmente a la producción heterogénea de dos tipos de betalactamasas inducibles, L₁ y L₂ (Paton *et al.*, 1994 y Avison *et al.*, 2001). Anteriormente se pensaba que la codificación de estas enzimas era del tipo cromosómico. Sin embargo, un estudio realizado por Walsh *et al.*, (1994), demuestra que la codificación de estas enzimas se localiza en un fragmento de tipo plasmídico de gran tamaño que puede considerarse como parte de un cromosoma fragmentado

CONCLUSIONES

Las cepas con más prevalencia fueron *Pseudomonas aeruginosa*, seguida por *Stenotrophomona maltophilia*.

Las cepas de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* presentaron variaciones en el patrón de identificación, que puede ser producto de cambios en el metabolismo de la bacteria.

En *S. maltophilia*, al momento de aplicar los esquemas de identificación debe considerarse la prueba de oxidasa, teniendo en cuenta la posibilidad de cepas oxidasa positiva.

Los resultados de este estudio indican que en la estación del mercado municipal, cepas como *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* son resistentes a antibiótico de importancia clínica como los betalactámicos, convirtiéndose en una amenaza de salud pública para las zonas adyacentes a este reservorio de agua.

S. maltophilia presentó un fenotipo de resistencia natural de su especie

Las cepas de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* mostraron en su mayoría plásmidos de alto peso molecular ($\geq 10,00\text{Kb}$ aproximadamente).

RECOMENDACIONES

Realizar estudios más completos para determinar las bacterias presentes en el río Manzanares.

Crear programas para el manejo adecuado de los antibióticos basados en la epidemiología local, así como utilizar estrategias para la prevención y control de la diseminación de estas bacterias con resistencia múltiple.

Implementar programas de educación para el uso racional de los antibióticos y el lavado de manos, como medidas efectivas para el control de la resistencia bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

Aguero, M.; Deluca, K.; Timmis, F. y Cabello, C. 1984. A plasmid-encoded outer membrane protein that enhances resistance of *Escherichia coli* to Phagocytosis. *Infection and Immunity*, 46 (3): 740-746.

Angulo, F. 2000. Antimicrobial Agents in aquaculture: Potential Impact on Public Health. *APUA. Newslett*, 18: 14-15.

Alonso, A.; Sánchez, P. y Martínez, J. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Minireview Environmental Microbiology*, 3 (1): 1-9.

Álvarez, A.; Mariscal, A.; Pérez, J. y Espigares, M. 1981. Actividades bioquímicas bacterianas de origen plasmídico. *Laboratorio (Granada)*, 72 (428): 129-159.

Amin, M.; Morgenroth, E.; Raskin, I.; Torkian, A.; Bina, B. y Mavahedian, H. 2004. Influence of the antibiotic erythromycin on anaerobic treatment of a pharmaceutical wastewater. *Journal of Research in medical Science*, 9 (5): 52-58

Antón, D.; Araque, Y.; De Donato, M.; Medina, B. y Marcano, M. 2005. Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Kasmera*, 33 (2): 109-118.

Antón, D. 2006. Aislamiento y caracterización de plásmidos de resistencia en cepas de *Stenotrophomona maltophilia* provenientes de muestras clínicas de pacientes recluidos en unidades de cuidados críticos. Trabajo para optar al título de *Magister Scientiarum* en Biología Aplicada mención Microbiología Aplicada. Posgrado de Biología Aplicada. Universidad de Oriente, Cumaná.

Araque, Y.; Vitelli, F. y Rodriguez, L. 2001. Identificación de *Burkholderia spp.* y *Stenotrophomona maltophilia* por métodos convencionales y el sistema

ATP/plus. Libro de resúmenes XXVII Jornada Venezolana de microbiología “Dr. José Vicente Scorza”. Pag 216.

Arias, M.; Monge, R.; Artavia, J. y González, G. 2000. Antimicrobial susceptibility pattern of Gram negative bacterias isolated from enteral feeding. *Revista Biomédica*, 11: 169-174.

Ash, R.; Mauck, B. y Morgan, M. 2002. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging infectious Diseases*, 8 (7): 713-716.

Avison, M.; Huggins, C.; vonHeldreich, C.; Bennett, P. y Walsh, T. 2001. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 B-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemother*, 45: 412-419.

Bastl, F.; Daly, S.; De Grandis, R. y Stevenson, M. 1988. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* epidemiological markers of furunculosis infection in fish. *Journal Fish of Diseases*, 11: 133-145.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standard sized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

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

Birboin, H. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleid Acids Research*, 7: 1513-1523.

Boxall, A. 2004. The environmental side effects of medication. *European Molecular Biology Organization*, 5: 1110-1116.

Bush, K. y Mobashery, S. 1998. New β -Lactamases in Gram-negative

bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 71-98.

Cabello, F. 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Revista Médica de Chile*, 132: 1001-1006.

Calvo, A.; Rodríguez, C.; Andrade, O.; Márquez, N.; Bertuglia, F. y Peña, C. 2002. Incidencia de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo atípico de resistencia atribuible a pérdida de la porina OprD. *Act Infectious*, 9: 21-26.

Carmona, O.; Guzmán, M.; Silva, H.; Pulido, S. y GVRB. 1992. Vigilancia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Cuarto Informe. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 12: 11-22.

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*.

Cattoir, V.; Poirel, L.; Aubert, C.; Soussy, C. y Nordmann, P. 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance Determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (2): 231-237.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Document M100-S18. Wayne, Pennsylvania.

Correa-Basurto, A.; Núñez-Cardona, M. y Peña-Betancourt, S. 2007. Bacterias heterótrofas aisladas del lago de los Reyes Aztecas (Tlahuac) y su resistencia a diferentes antibióticos. *Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3 (1): 84-89.

Davey, R. y Reaney, C. 1980. Extrachromosomal genetic elements and the adaptive evolution of bacteria. *Evolutionary Biology*, 13: 113-147.

Davies, J. y Welb, V. 1998. Antibiotic resistance in bacteria. En: *Emerging*

infections biomedical research report. Krause R (ed). New York: Academic Press, 95: 239-273.

De Vicente, A.; Codina, J.; Borrego, J. y Romero, P. 1991. Relationship between *Pseudomonas aeruginosa* and bacteria indicators in polluted natural waters. *Water Science y technology*, 24: 121-124.

Demaneche, S.; Kay, E.; Gourbiere, F. y Simonet, P. 2001. Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2617-2621.

Dowling, H. 2000. *Fighting infection*. Conquests of the twentieth century. Harvard University Press, Cambridge. Págs. 5675-5684.

Eberhardt, C.; Kuerschner, L. y Weiss, D. 2003. Probing the catalytic activity of a cell division-specific Transpeptidase *in vivo* with β -Lactams. *Journal of Bacteriology*, 185: 3726-373.

Fass, R.; Banishan, J.; Solomon, M. y Ayers, L. 1996. *In vitro* activities of quinolonas, b-lactams, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxole against non-fermentative Gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 1412-1418.

Fernández, E. 1984. Contaminación de los ríos Guasdua y Manzanares, Estado Sucre, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico Venezuela*, 23 (1): 113-128.

Ferrús, M.; Alonso, J.; Amorós, I.; Hernández, M. y Hernández, J. 1999. A rapid procedure for the isolation of plasmid DNA from environmental bacteria. *International Microbiology*, 2: 115-117.

Gales, A.; Menezes, L.; Silbert, S. y Sader, S. 2003. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenemes-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 699-702.

Giger, W.; Alder, A.; Golet, E.; Kohler, H.; Mc Ardell, C.; Molnar, E.; Siegrist,

H. y Suter, M. 2003. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters sewage sludges, and surface waters. *Chimia*, 57 (9): 485-491.

González, M. 2010. Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* formadores de biopelículas en la cuenca del río Manzanares, Cumaná, estado Sucre. Tesis de pregrado, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente Cumaná.

Goñi-Urriza, M.; Capdepuy, M.; Arpin, C.; Raymond, N.; Caumette, P. y Quentin, C. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 125-132.

Gorbach, S. 2001. Antimicrobial use in animal feed. Time to stop. *New England Journal of Medicine*, 345: 1202-1203.

Guardabassi, L.; Petersen, A.; Olsen, Je. y Dalsgaard, A. 1998. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9): 3499-3502.

Gutiérrez, A. 2005. Evaluación fisicoquímica y microbiológica de las aguas superficiales de la cuenca alta, media y baja del río Manzanares, durante el periodo Mayo 2002 - Junio 2003. Trabajo de posgrado Msc. Ciencias Marinas, Mención Oceanografía Química. Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná.

Hasanuzzaman, M.; Umadhay-Briones, K.; Zsiros, S. ; Morita, N.; Nodasaka, Y, Yumoto, I. y Okuyama, H. 2004. Isolation, identification and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. *Current Microbiology*, 49: 108-114.

Hisham, Z. y Finch, G. 2001. Resistencia antibiótica en el año 2000. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19: 91-92.

Juarez-Figueroa. L; Silva- Sánchez, J.; Uribe, F. y Cifuentes, E. 2003. Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco Canals, Mexico City. *Salud Publica Mexico*, 45: 389-395.

Kapil, A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: needs to contemplate. *Indian Journal of Medical Research*, 121: 83-91

Keith, S.; Henry, S. y Elias, A. 2000. Pathogens resistant to antimicrobial agents, epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14 (2): 293-319.

Kimata, N.; Nishino, T.; Suzuki, S. y Ogure, K. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. *Microbial Ecology*, 47: 41-47.

Kolpin, W.; Furlong, T.; Meyer, T.; Thurman, M. Zaugg, D.; Barber, B. y Buxton, T. 2002. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36: 1202-1211.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P.; Winn, W.; Procop, G. y Woods, G. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Kotra, L. y Mobashery, S. 1999. Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47: 211-216.

Kümmerer, K. 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 311-320.

Lenski, R. 1998. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology*, 1: 265-270

Livermore, D. 1991. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, 78(Suppl.): 7-16.

Livermore, D. 2002. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Current opinion in investigational Drugs*, 3: 218-24.

Lösch, L.; Merino, L. y Alonso, J. 2005. Resistencia antimicrobiana en cepas

de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco (Argentina). Comunicaciones científicas y tecnológicas. Campus Resistencia. Instituto de Medicina Regional Universidad Nacional del Nordeste. M-014

Mariscal, A.; Alvarez, A.; Espigares, M. y Pérez, A. 1981. Clasificación y estructura molecular de los plásmidos. *Laboratorio (Granada)*, 72 (427): 21 - 49.

Martínez, G.; Alvarado, J. y Senior, W. 2001. Estudios físico-químicos de las aguas superficiales de la baja y pluma del río Manzanares. *Interciencia*, 26 (8): 342-351.

Moore, J.; Heaney, N.; Millar, B.; Crowe, M. y Elborn, J. 2002. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Journal Communicable Disease and Public Health*, 5: 23-26.

Nikbin, V.; Abdi-Ali; A.; Feizabadi, M. y Gharavi, S. 2007. Pulsed field gel electrophoresis and plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. *Indian Journal of Medical Research*, 126: 146 - 151.

Paton, R.; Miles, R. y Amyes, S. 1994. Biochemical properties of inducible β -lactamases from *Xanthomonas malthophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 2143-2149.

Pirnay, J.; Matthijs, S. y Colak, H. 2005. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environmental Microbiology*, 7: 969-980.

Pitout, J.; Sanders, C. y Sanders, W. 1997. Antibiotic resistance with focus β -lactam resistance in Gram negative bacilli. *The American journal of Medicine*, 103: 51-59.

Pollack, M. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Enfermedades Infecciosas. Principio y Practica*. Mandell, Douglas, Bennet. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

Rockne, k.; Chee-Sanford, R.; Brian, P.; James, T. y Staleyand, S. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-

reductions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4): 1595-1601.

Sánchez, P.; Moreno, E. y Martínez, J. 2005. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the smedf multidrug efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 781-782.

Senior, W.; Fermín, I. y Mata, F. 2004. Diagnóstico ambiental y participación comunitaria para el control de la contaminación del río Manzanares, estado Sucre, Venezuela. *PNUMA*.

Sorum, H. y L'abee-lund, M. 2002 Antibiotic resistance in food related bacteria, a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 43-56.

Stelling, J. y O'Brien, T. 1997. Surveillance of antimicrobial resistance: The who net program. *Clinical Infectious Diseases*, 24: S157-S168.

Suárez, C.; Kattán, J.; Guzmán, A. y Villegas, M. 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Asociación Colombiana de infectología*, 10 (2): 85-93.

Téllez, R.; Sánchez, M.; Martínez, T.; Molina, G. y Ranno, G. 2000. Valoración de la sensibilidad de los gérmenes aeróbicos en cuidados intensivos. *Actualización en Infectología*, 16: 19-29.

Thompson, B. 1994. Bacterial antibiotic resistance proof of evolution? *Reason and Revelation*, 14: 61-63.

Vila, J.; Marti, S. y Sánchez-Cespedes, J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59:1210-1215.

Vay, C.; Almuzara, M.; Rodríguez, C.; Pugliese, F.; Barba, L.; Mattera, J. y Famiglietti, A. 2005. Actividad "in vitro" de diferentes antimicrobianos sobre bacilos Gram negativos no fermentadores, excluidos *Pseudomonas aeruginosa* y

Acinetobacter spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(1): 1-23.

Walsh, T.; Hall, L.; Assinder, S.; Nichols, W.; Cartwright, S.; Macgowan, A. y Bennett, P. 1994. *Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from Xanthomonas maltophilia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1218: 199-201.

HOJA DE METADATOS

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

Título	DETECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES RESISTENTE A BETALACTÁMICOS, PROVENIENTES DEL RÍO MANZANARES; ESTADO SUCRE.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Nazaret G., Aura.	CVLAC	11376062
	e-mail	arnazaret@yahoo.es
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

RÍO MANZANARES
DETECCIÓN DE PLÁSMIDOS
BETALACTÁMICOS

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencia	Biología

Resumen (abstract):

Se evaluó la detección de plásmidos en bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) resistente a betalactámicos, aislados de aguas del río Manzanares, del Estado Sucre, durante los meses febrero–junio de 2008. Cincuenta y cuatro aislados bacterianos fueron identificados por pruebas bioquímicas convencionales y se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana con el método de difusión con discos en agar Müller Hinton. Los plásmidos fueron aislados por el método de lisis alcalina y visualizados en gel de agarosa al 0,80%. En el presente estudio se identificaron 35 (65,81%) cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 22,22% cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* y 1,85% cepas de *Burkholderia cepacia*. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron resistencia a cefotaxima (68,60%); meropenem (57,19%), imipenem (22,89%), piperacilina tazobactam (42,81%) y aztreonam (42,81%); mientras que las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* mostraron resistencia a todos los antibióticos utilizados en este estudio. En *P. aeruginosa* se obtuvieron catorce fenotipos diferentes a través de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, sin embargo, para *S. maltophilia* se observó la presencia de cinco fenotipos diferentes. El aislamiento de los plásmido se realizó en las cepas que mostraron resistencia a más de tres betalactámicos, de las cuales, siete fueron *P. aeruginosa*, siete *S. maltophilia* y una *B. cepacia*. En *P. aeruginosa* se observó la presencia de bandas plásmidicas que van desde 5,00 hasta $\geq 10,00$ Kb, aproximadamente. Las cepas de *S. maltophilia* mostraron bandas plásmidicas de alto peso molecular que van desde 3,00 hasta $\geq 10,00$ Kb aproximadamente.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Dina Antón	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8647499
	e-mail	dinacar@hotmail.com
	e-mail	
Luz Bettina Villalobos de Bastardo	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5162987
	e-mail	Lbvillalobosb@yahoo.com
	e-mail	
Elsa Salazar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10460717
	e-mail	Elsazul2003@yahoo.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2011	12	08
------	----	----

Lenguaje: spa _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-nazareta.doc	Application/Word.doc

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Lcda. Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Biología

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

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Magley*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolanos Cunele

JUAN A. BOLANOS CUNELE
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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

Derechos:

Yo Aura Nazaret Guerra como autora intelectual de esta tesis le doy el derecho a la Universidad de Oriente para divulgar esta tesis siempre y cuando resguardando la patente de industria y comercio si se diera el caso

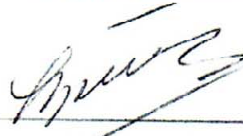


AUTOR 1

AURA ROSA NAZARET



TUTOR
Dina Antón



JURADO 1
Luz Bettina Villalobos



JURADO 2
Elsa Salazar

POR LA COMISIÓN DE TESIS:
