



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

BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR AISLADOS AMBIENTALES  
DE *Klebsiella* sp. PROVENIENTES DE LAS CUENCAS ALTA, MEDIA Y BAJA  
DEL RÍO MANZANARES, ESTADO SUCRE  
(Modalidad: Investigación)

PATRICIA LORENA PÉREZ JIMÉNEZ

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

CUMANÁ, 2009

BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR AISLADOS AMBIENTALES  
DE *Klebsiella* sp. PROVENIENTES DE LAS CUENCAS ALTA, MEDIA Y BAJA  
DEL RÍO MANZANARES, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

---

Dra. Yasmina Araque C.  
Asesora

---

---

## INDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	7
Localización del río.....	7
Toma de muestra.....	8
Dilución de la muestra .....	8
Caracterización morfológica de las colonias.....	8
Caracterización microscópica .....	9
Subcultivo en agar Mac Conkey y Luria Bertani.....	9
Pruebas bioquímicas para identificar bacterias del género <i>Klebsiella</i> y otras enterobacterias.....	9
Prueba de la citocromo oxidasa.....	9
Utilización de la glucosa .....	10
Utilización de citrato de Simmons .....	10
Utilización de azúcares y producción de ácido sulfhídrico.....	11
Descarboxilación de la lisina .....	11
Producción de motilidad, indol, ornitina.....	12
Utilización de fenilalanina .....	12
Utilización del malonato .....	12
Hidrólisis de la urea (agua peptonada).....	13
Utilización de sorbitol e inositol .....	13
Identificación bioquímica de bacilos Gramnegativos no fermentadores (BGNNF).....	13

Identificación del género <i>Staphylococcus</i> sp. ....	13
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	14
Antagonismo bacteriano .....	14
Concentración mínima inhibitoria .....	16
Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN .....	22
CONCLUSIONES .....	28
RECOMENDACIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA .....	30
APÉNDICE.....	36
HOJAS DE METADATOS .....	38

## **DEDICATORIA**

A Dios, por tener siempre su iluminación, sabiduría y fortaleza para el logro de esta meta.

Con amor y gratitud a mi madre Seilán Jiménez, mujer que es gran evidencia de esfuerzo y superación en la vida; gracias por hacer todo lo que estuvo a tu alcance y más para que realizara mis sueños (no te tocó fácil Má).

A mi padre, a quien esto lo hubiera llenado de mucho orgullo.

A mis abuelos, quienes fueron parte especial de mi vida, va dedicado muy especialmente a ustedes.

A mi lindo sobrino Héctor, que esto te sirva de guía y ejemplo para el futuro.

A mi familia, muchísimas gracias por apoyarme en todo momento.

A mis amigas Ángela, Jenire, Olymar y Patricia, este trabajo es en parte suyo chicas.

Para todas las personas que me ayudaron desde el inicio de esta carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haberme dado la fortaleza para superar las dificultades y cumplir todas mis metas.

Muy especialmente a la profesora Yasmina Araque, por haberme ofrecido este proyecto, muchas gracias por ser mi asesora y apoyarme con sus consejos y conocimientos.

A la profesora Dina Antón, muchas gracias profesora por todo el apoyo que me brindó siempre.

A la profesora Sara Centeno y al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Oriente, muchas gracias por su colaboración.

A todos los profesores, técnicos y tesistas que integran el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Bioanálisis, les estoy muy agradecida por toda la colaboración que me brindaron.

Muy especialmente a los señores Desiderio Santana, Nidia de Santana, José Mier y Terán, Elia Hernández y Dhamelys Correa; no existen suficientes palabras para describir lo agradecido que estoy hacia ustedes, muchas gracias por la confianza que pusieron en mí, así mismo, muchas gracias a Estefanía Urbina por acompañarme en las noches mientras estaba escribiendo, a Natalia y a Rodrigo, chicos muchas gracias.

A mis muy grandes y queridas amigas Ángela, Patricia y Olymar; gracias mis locas por acompañarme en todo momento, les debo mucho a todas.

A mis amigas y compañeras Adriana y Marielys, quienes formaron parte especial en la realización de este trabajo; gracias por su colaboración y ayuda.

A mi compañera, hermana y mejor amiga Jenire Barrios, a ti te estaré eternamente agradecida por todas las cosas buenas que me has brindado a lo largo de nuestra amistad; gracias por toda la ayuda que me supiste prestar mientras realizábamos este trabajo, aún cuando no te la pedía, muchas gracias amiga, te quiero mucho.

Por último, pero igual de importante a todos mis compañeros de estudios, son muchos así que no los nombraré, a todos ustedes muchas gracias y nunca los olvidaré.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contaje de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), en las diferentes cuencas del río Manzanares, estado Sucre. ....	17
Tabla 2. Diversidad de especies bacterianas aisladas en las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.....	18
Tabla 3. Porcentaje de enterobacterias aisladas de la cuenca alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre. ....	18
Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de enterobacterias aisladas de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.....	19
Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de <i>Klebsiella</i> sp. aisladas de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.....	19
Tabla 6. Fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana de enterobacterias aisladas de la cuenca alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.....	20



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización de la cuenca hidrográfica del río Manzanares, estado Sucre. ..	7
Figura 2. <i>K. pneumoniae</i> CVCM 797 productora de bacteriocina, contra <i>E. coli</i> K12 CVCM 178. Cepas de <i>Klebsiella</i> (K01- K07) no productoras de bacteriocinas, aisladas de las cuencas del río Manzanares.....	21

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la producción de bacteriocinas en bacterias pertenecientes al género *Klebsiella*, aisladas de muestras de agua provenientes de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares del estado Sucre. Para la identificación de las cepas se realizó la caracterización, tanto macroscópica como microscópica, de las colonias de interés, así como, también pruebas bioquímicas convencionales; las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron por el método de difusión en agar, la producción de bacteriocinas se realizó aplicando la técnica de doble capa en agar LB, y se emplearon como cepas indicadoras tales como: *B. subtilis* CVCM 591, *E. coli* K-12 CVCM 178, *P. aeruginosa* CVCM 787 y *S. aureus* CVCM 636 y, además, cepas de otros géneros provenientes del río. Se aisló un total de 101 cepas bacterianas, de las cuales, 29 se identificaron como *Staphylococcus*, 21 *Aeromonas*, 23 pertenecieron a la familia *Enterobacteriaceae*, 16 *Pseudomonas* y 12 BGNNF. De las cepas de enterobacterias, 8 correspondieron al género *Klebsiella*. 56,52% de las cepas de enterobacterias resultaron resistentes a cefalotina; 30,43% a ciprofloxacina, un y 4,35% a ceftazidima y aztreonam, respectivamente; Para cefoperazona, imipenem y amikacina las cepas presentaron un 100% de sensibilidad. Ninguna de las especies de *Klebsiella* estudiadas presentaron producción de bacteriocinas al hacerla actuar contra cepas indicadoras y con algunas de las aisladas del río, solo las cepas controles (*K. pneumoniae* CVCM 797, *K. pneumoniae*, CVCM 799 y *K. pneumoniae* CVCM 800), presentaron efecto antagónico contra las cepas indicadoras; esto pudo deberse a que esta característica es expresada en su mayoría por la especie *K. pneumoniae*, las cuales no fueron halladas en la investigación.

## INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies, presentan morfología de bacilos o cocobacilos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes), de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en tierra, en plantas o en animales acuáticos; y algunos géneros como *Salmonella*, *Shigella*, y *Yersinia* son enteropatógenos humanos importantes (Ocaña *et al.*, 2007). Con frecuencia se emplean especies de *Enterobacteriaceae* en la bio-industria: en la producción de alcoholes, producción de toxinas, en la industria cosmética, en la fabricación de agente antimicrobianos, vacunas, entre otros (Huang *et al.*, 2002).

En 1985, Trevisan designó al género *Klebsiella* en honor del microbiólogo alemán Edwin Klebs, quien describió la especie *Klebsiella pneumoniae* en 1887. Históricamente, las especies de *Klebsiella*, como las de muchas otras bacterias, se establecieron basándose en su patología o en su origen. Debido a esto, su nomenclatura ha estado sujeta a cambios con nuevas propuestas en su denominación, sinónimas de otras ya propuestas (Izquierdo, 2003).

El género *Klebsiella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, agrupa a bacilos Gramnegativos inmóviles, aerobios y quimioorganotrofos, que poseen una cápsula prominente de polisacárido; esta cápsula cubre la superficie entera de la célula, lo que explica el aspecto grande del organismo, y proporciona resistencia contra muchos mecanismos de defensa del medio ambiente y del hospedador; se localizan en el suelo, agua, tracto digestivo y respiratorio de los humanos y otros animales (Andrade y Silva, 2004).

Este género reúne a las especies *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*. La de mayor importancia epidemiológica es *K. pneumoniae*, con tres subespecies denominadas *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Las especies del género *Klebsiella* son bacterias negativas al indol (excepto *K. oxytoca*), positivas con la reacción de Voges-Proskauer, capaces de crecer en un medio con cianuro de potasio (KCN) y en medios con citrato como única fuente de carbono. Todas las especies fermentan la lactosa y ninguna es productora de ácido sulfhídrico (Chaves, 2002).

Generalmente, las especies de este género son causantes de infecciones en el tracto respiratorio, urinario y gastrointestinal humano, tanto en pacientes sanos como en aquellos con diferentes situaciones de inmunodepresión (Fox, 2006).

Dentro de los hábitats predilectos de este género bacteriano se encuentra el agua, pudiendo estar allí de forma natural o por procesos de contaminación, ya que las concentraciones poblacionales hacen que los desechos generados por las actividades sociales y productivas se manifiesten con mayor incidencia y peligro en el medio ambiente, como la deposición de excretas por parte de seres humanos y animales, vertido de aguas residuales por parte de las industrias, entre otros (Rosas *et al.*, 1994).

Los miembros del género *Klebsiella* expresan típicamente 2 tipos de antígenos en la superficie de la célula. El primero es el antígeno lipopolisacárido (antígeno O); el otro es un polisacárido capsular (antígeno K), ambos antígenos contribuyen a su patogenicidad. Existen cerca de 77 antígenos K y 9 antígenos O. La variabilidad estructural de estos antígenos forma la base para la clasificación en varios serotipos, cuya virulencia es similar en todos los serotipos (Andrade y Silva, 2004).

La presencia de la cápsula, de naturaleza polisacárida, le confiere al género *Klebsiella* resistencia al medio ambiente, permitiendo su multiplicación; estas bacterias también poseen una actividad cambiante, permitiendo la existencia de una multitud de variadas cepas, muchas de las cuales producen beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y que son las responsables de su resistencia a los  $\beta$ -Lactámicos; además, cada cepa presenta perfiles de resistencia variable a diferentes agentes antimicrobianos (De la Parte *et al.*, 2001; Izquierdo, 2003).

Otro mecanismo relacionado con la virulencia y la patogenicidad del género *Klebsiella* es la producción de bacteriocinas, las cuales son sustancias de naturaleza proteica, que actúan como bactericidas, sintetizadas por algunas bacterias, así como también, actúan sobre otra cepa de la misma especie o especies relacionadas, manteniendo un equilibrio entre diferentes poblaciones en un mismo ambiente. Las bacteriocinas son fenotípicamente análogas a los factores de destrucción de las levaduras y el *Paramecium*, y poseen diversidad estructural, funcional y ecológica (Harnett y Gyles, 1984).

Las bacteriocinas están constituidas por un componente proteico esencial y dependiendo del tipo de bacteriocinas, se unen carbohidratos, lípidos, fosfatos y DNA; la información genética para codificar las bacteriocinas puede estar localizada en cromosomas, plásmidos o ambos. Además del gen estructural que codifica la bacteriocina, existen otros elementos genéticos importantes que incluyen al gen que codifica la toxina, el de inmunidad, el cual codifica una proteína que confiere inmunidad específica a la célula productora, mediante unión e inactivación de la toxina; y un gen de lisis, el cual codifica una proteína involucrada en la liberación de la bacteriocina (Pitt y Gaston, 1995; Sánchez, 2006; Cascales *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas es muy diverso, puede involucrar

bloqueos metabólicos, cambios de permeabilidad en la membrana celular, daño o degradación de DNA, entre otros (Harnett y Gyles, 1984).

En base a su modo de acción, las bacteriocinas han sido clasificadas en dos grupos: bacteriocinas enzimáticas y las formadoras de canales. Las primeras destruyen a las células sensibles por degradación de su DNA o inhibición de la síntesis proteica. Las segundas ejercen su efecto letal mediante la formación de canales iónicos, dependientes de energía en la membrana citoplasmática de la célula sensible (Braun *et al.*, 1994).

Otro modo de acción de las bacteriocinas fue estudiado en una microcina (bacteriocina de bajo peso molecular) producida por *K. pneumoniae*, la microcina E492, la cual tiene un efecto antibiótico y actúa sobre bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*; además de su efecto antibiótico, esta bacteriocina produce un efecto citotóxico sobre algunas líneas celulares humanas mediante la inducción de la apoptosis (Hentz *et al.*, 2002).

En otro estudio sobre las bacteriocinas de *K. pneumoniae*, en los que se estudian cepas productoras de las mismas, se comprobó que ésta ejerce cierta actividad inhibitoria sobre bacterias como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* (Castillo, 1979).

Según Koneman *et al.* (2004), en las aguas existe, en forma natural, una amplia variedad de microorganismos que no necesariamente son patógenos, entre los que se encuentran bacterias, hongos, algas y helmintos; parte de éstos son considerados indicadores de contaminación, como lo son las bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y huevos de helmintos.

El grupo de microorganismos denominado coliforme, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que mayoritariamente se encuentran colonizando las aguas de ríos son *E. coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. y *K. pneumoniae*. Este grupo es indicador de contaminación fecal, ya que el hombre descarga junto a los organismos coliformes, otros microorganismos patógenos, entre los que se encuentran *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Vibrio cholerae*, causantes de enfermedades como la fiebre tifoidea, diarrea, disentería y cólera, respectivamente (Paz *et al.*, 2003).

Hoy en día, la contaminación de nuestro entorno está considerada como un serio problema que incluye varios aspectos, como la salud pública. En el río Manzanares, principal afluente del estado Sucre, las fuentes de contaminación más importantes son las producidas por la industria licorera, las areneras, las pequeñas granjas situadas en sus alrededores, prácticas agrícolas, la industria pesquera, entre otras actividades, y por los asentamientos humanos ubicados en la cuenca media; los cuales no cuentan con un sistema de tratamiento de aguas negras las cuales son vertidas al ecosistema, sin la consideración que este cuerpo de agua se está contaminando y que puede servir de fuente para el suministro de agua de consumo humano, uso recreativo, industrial y para otros fines (Márquez *et al.*, 2000; Zambrano *et al.*, 2002; Benítez, 2004).

Desde su introducción como drogas hace unos sesenta años, los agentes quimioterapéuticos antimicrobianos, naturales, semisintéticos y otros agentes sintéticos como las sulfonamidas y quinolonas, han jugado un papel esencial, junto con las medidas preventivas, como la vacunación, en la disminución de la morbilidad y la mortalidad causadas por las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el amplio uso, mal uso y abuso de los antimicrobianos, tanto en el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas en el ser humano, en medicina veterinaria, el empleo de promotores de crecimiento en la producción animal y en agricultura, han causado una

exposición por parte de las bacterias con diferentes antimicrobianos a concentraciones diversas, lo que ha originado una presión selectiva entre las poblaciones bacterianas, dando como resultado un incremento de bacterias con resistencia adquirida a drogas antimicrobianas (García, 2001; Zambrano *et al.*, 2002).

Conociendo que cepas de *Klebsiella* sp. forman parte de flora natural de los cauces de los ríos, además de la cantidad de microorganismos patógenos productores de cuadros infecciosos en el hombre y animales, que también pueden ser encontrados en ellos, el propósito de este trabajo fue la detección de cepas de *Klebsiella* sp. productoras de bacteriocinas, provenientes de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares del estado Sucre; a fin de aportar datos que permitan ubicar a mediano plazo estrategias para la descontaminación del río Manzanares, empleando sustancias producidas por la flora microbiana propia del río que puede antagonizar otros patógenos bacterianos.



# METODOLOGÍA

## Localización del río

El río Manzanares está ubicado en la región nor-oriental del país, en el estado Sucre, con una longitud de cauce de 81Km, su cuenca se encuentra entre las coordenadas 10° 05' 30" y 10° 29' 20" latitud norte y 63° 45' 30" y 63° 19' 20" longitud oeste, tiene su nacimiento en el macizo montañoso oriental serranía del Turimiquire, a 2000 metros sobre el nivel del mar. Recibe por sus márgenes derechos 9 ríos ,13 riachuelos y quebradas, y por el margen izquierdo 14 ríos principales y 6 secundarios. El río Manzanares desemboca en el Golfo de Cariaco, formando un pluma de descarga laminar que se extiende por toda la zona costera de la ciudad de Cumaná (Márquez *et al.*, 2000; Benítez *et al.*, 2004).

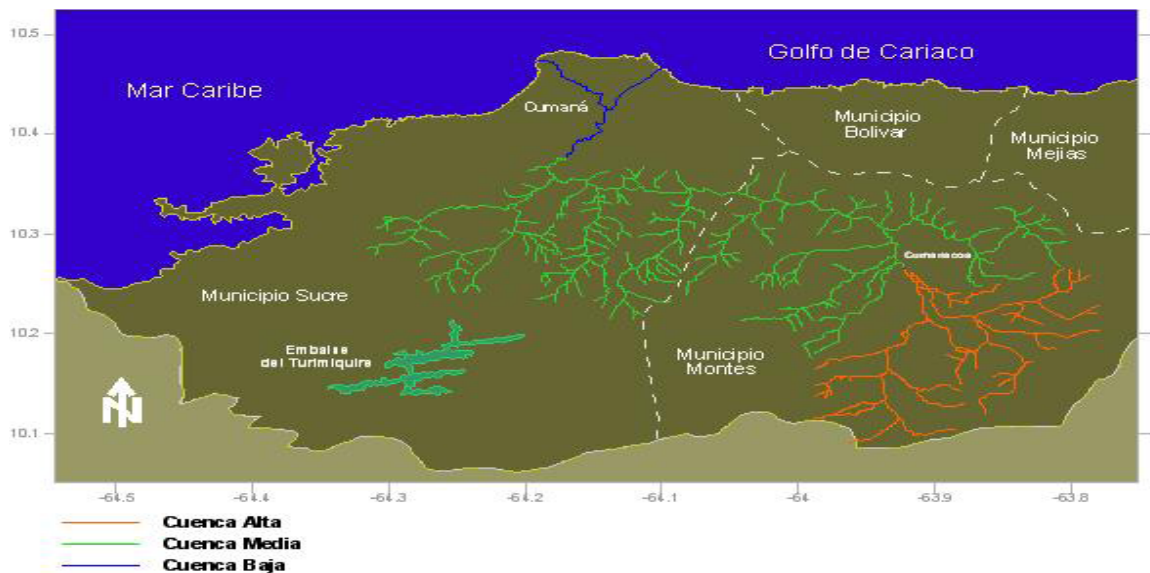


Figura 1. Localización de la cuenca hidrográfica del río Manzanares, estado Sucre.

## **Toma de muestra**

Se realizaron tres muestreos por duplicado, durante un periodo de 6 meses; las muestras fueron recogidas en siete subestaciones de las distintas cuencas del río Manzanares, distribuidas de la siguiente manera: cuenca alta (La Fragua, los Dos Ríos y la Fuente), cuenca media (Río Arenas y Río San Juan) y cuenca baja (Manzanares, a la altura del aliviadero y detrás del mercado municipal de Cumaná). Las muestras de agua fueron recogidas en envases de plástico estériles de 100 ml; recolectándose un volumen total de agua de 100 ml para el análisis bacteriológico de la misma, estas fueron recogidas a unos 20-30 cm por debajo de la superficie del río, abriéndose y cerrándose los envases dentro del agua para evitar una posible contaminación. Luego se transportaron en cavas refrigeradas y en condiciones de aerobiosis al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo, de Sucre (Milne, 1989).

## **Dilución de la muestra**

A las muestras de agua recolectadas se le realizaron diluciones seriadas en caldo Luria Bertani (LB), desde  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  y, a partir de la dilución  $10^{-3}$ , se sembró 1 ml de las respectivas diluciones en 15 ml de agar LB fundido colocado en placas de Petri. Posteriormente, las placas se incubaron a 32°C por 24 horas en aerobiosis, luego se estimó el conteo total de la flora microbiana cultivable y la diversidad de la misma (Mulusky, 1974).

## **Caracterización morfológica de las colonias**

La selección de colonias se hizo tomando en cuenta características morfológicas tales como: aspecto, consistencia, tamaño, forma y producción de pigmento.

## **Caracterización microscópica**

De las colonias de interés se realizó un estudio microscópico mediante el uso de la coloración de Gram, lo cual permitió observar la variedad de microorganismos existentes, la pureza de las colonias, así como, también diferenciar la variedad de bacterias tanto Gramnegativos como Grampositivos.

## **Subcultivo en agar Mac Conkey y Luria Bertani**

Las colonias identificadas como bacilos Gramnegativos se subcultivaron en agar LB y agar Mac Conkey (el agar Mac Conkey permite el crecimiento de bacilos entéricos fermentadores o no de la lactosa, evidenciado por la producción de colonias con tonos variables de rojo, por el cambio del color del indicador rojo neutro, en el caso de las fermentadoras y colonias incoloras en el caso de las no fermentadoras), las mismas fueron incubadas de 24 hasta 72 horas, dependiendo del tiempo de crecimiento óptimo, a una temperatura de 32°C en aerobiosis.

## **Pruebas bioquímicas para identificar bacterias del género *Klebsiella* y otras enterobacterias**

Se realizaron a partir de un inóculo en caldo BHI preparado con colonias purificadas obtenidas de la siembra en agar MacConkey (Freeman, 1986; Koneman *et al.*, 2004). Todas las pruebas bioquímicas fueron realizadas e interpretadas siguiendo la metodología descrita por Koneman *et al.* (2004).

## **Prueba de la citocromo oxidasa**

Esta prueba se usó para determinar la presencia o no de la enzima oxidasa. La

reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular, produciendo agua o peróxido de hidrógeno, según la especie. En un papel de filtro impregnado con gotas del reactivo tetrametil parafenilendiamina al 3%, se colocó una colonia del microorganismo en cuestión proveniente del subcultivo en agar LB. Se dejó actuar, aproximadamente, 10 segundos, siendo positivo al aparecer un color morado en el sitio donde se colocó el inóculo y negativo cuando no hubo ningún cambio, que es característico de la familia *Enterobacteriaceae*.

### **Utilización de la glucosa**

Se inocularon las colonias sospechosas en tubos que contenían caldo rojo de metilo, que luego se incubaron a 32°C durante 24 horas. Completado el tiempo, a cada tubo se le agregaron tres gotas del reactivo de rojo de metilo, la prueba se consideró positiva cuando, en la superficie del medio se mantuvo un anillo de color rojo, y negativa cuando el indicador de rojo de metilo tuvo un viraje a amarillo. Esta prueba permitió determinar si la bacteria degrada la glucosa del medio por la vía de los ácidos mixtos o la vía del butilenglicol.

### **Utilización de citrato de Simmons**

En tubos con medio citrato solidificado en bisel, se procedió a realizar la siembra de la colonia sospechosa por estría, en la superficie del medio, y luego se incubó a 32°C, durante 24 horas. Esta prueba se utilizó para determinar si la bacteria es capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno para su metabolismo, lo que provocó así la alcalinidad del medio y, por lo tanto, la producción de un color azul, debido al indicador azul de bromotimol; de esta manera la prueba se consideró como positiva; de igual modo, la presencia de

crecimiento bacteriano en la superficie del medio se consideró como una prueba positiva, así el medio no presentara cambio de color.

### **Utilización de azúcares y producción de ácido sulfhídrico**

En tubos con el medio hierro triple azúcar (TSI) solidificado en bisel, se realizó la siembra de las colonias sospechosas mediante la técnica de punción y estría con un asa larga y extendida. Se dejó incubar a 32°C durante 24 horas. Este medio permitió la caracterización de las enterobacterias, tomando en cuenta la capacidad de fermentar los carbohidratos como la lactosa, glucosa y/o sacarosa, así como también, la formación de ácido sulfhídrico y gas carbónico.

La interpretación de la lectura se realizó de la siguiente manera: fondo ácido (amarillo) y pico alcalino (naranja): fermentación de la glucosa y sacarosa. Ácido todo el medio: fermentación de la glucosa, sacarosa y lactosa. Ennegrecimiento del medio: producción de ácido sulfhídrico. Burbujas de aire en el medio: producción de gas carbónico.

### **Descarboxilación de la lisina**

Se procedió a inocular la colonia sospechosa en tubos que contenían caldo lisina; luego, se le agregaron tres gotas de parafina líquida y se incubaron a 32°C por 24 horas. Esta prueba se utilizó con la finalidad de determinar la producción de la enzima descarboxilasa específica, por parte de la bacteria, capaz de desdoblar la lisina hasta cadaverina, la permanencia del color original del medio, dado por el indicador púrpura de bromocresol se consideró como una prueba positiva.

### **Producción de motilidad, indol, ornitina**

En tubos con medio motilidad indol ornitina (MIO), solidificado en forma de taco, se procedió a inocular las colonias sospechosas por punción, luego se incubó a 32°C por 24 horas. Esta prueba se utilizó para determinar la motilidad del microorganismo, la producción de indol y la descarboxilación de la ornitina. La motilidad se evidenció por la turbidez en el medio a partir de la línea de punción. La producción de indol se determinó por la formación de un anillo rojo brillante en la superficie del medio, al agregar el reactivo de Kovacs. La descarboxilación de la ornitina a putrescina, se evidenció por la permanencia del color original del medio, dado por el indicador púrpura de bromocresol.

### **Utilización de fenilalanina**

En los tubos con el medio fenilalanina solidificado en bisel, se inoculó por estría las colonias sospechosas en la superficie del medio y luego se incubó a 32°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, al medio se le agregaron 5 gotas de cloruro férrico, rotándose el tubo suavemente para cubrir toda la superficie. La prueba se consideró positiva si el producto de la desaminación de la fenilalanina, que es el ácido fenil pirúvico, al combinarse con el cloruro férrico, produjo una coloración verdosa inmediatamente.

### **Utilización del malonato**

Se inocularon las colonias sospechosas en tubos que contenían caldo malonato y se incubó a 32°C por 24 horas. Esta prueba permitió determinar la utilización, por parte de las bacterias, del malonato de sodio como fuente de carbono y el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, observándose un color azul, debido al indicador

azul de bromotimol, produciéndose una reacción positiva.

### **Hidrólisis de la urea (agua peptonada)**

Se inocularon las colonias sospechosas en tubos que contenían agua peptonada para urea, posteriormente se le agregó unas gotas del reactivo rojo fenol, y se incubó a 32°C por 24 horas. Con esta prueba se verificó la síntesis de la enzima ureasa, con producción de amoníaco, que se observó con un viraje del indicador rojo fenol de amarillo a rosado fucsia.

### **Utilización de sorbitol e inositol**

Se inocularon las colonias sospechosas en tubos que contenían caldos separados de sorbitol e inositol y, posteriormente, se incubaron a 32°C por 24 horas. Esta prueba se utilizó para determinar la capacidad de las bacterias de utilizar el carbohidrato presente en el medio, con la formación de ácido, mediante el cambio del indicador rojo fenol hasta un color amarillo en el medio.

### **Identificación bioquímica de bacilos Gramnegativos no fermentadores (BGNNF)**

Para la identificación bioquímica de los BGNNF, se emplearon las siguientes pruebas: TSI, citocromo oxidasa, motilidad, oxidación de azúcares (glucosa, sacarosa, maltosa y manitol), y descarboxilación de la lisina (Koneman *et al.*, 2004).

### **Identificación del género *Staphylococcus* sp.**

El grupo de bacterias identificadas como Grampositivas, se sembró en agar manitol salado y se les aplicaron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, coagulasa y fermentación del manitol (Koneman *et al.*, 2004).

## **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana**

Se empleó el método de difusión en agar, descrito por Bauer *et al.* (1966), siguiendo los lineamientos del Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI), por sus siglas en inglés, (CLSI, 2007). Se tomaron de 3-5 colonias aisladas del microorganismo de interés, provenientes del agar Mac Conkey y se suspendieron en 4,5 ml de solución salina fisiológica y se incubó a 32°C, hasta que se observó un grado de turbidez semejante al del patrón 0,5 de Mac Farland. Posteriormente, se realizó la siembra de la suspensión de bacterias en el agar Mueller Hinton, utilizando un hisopo que se humedeció en esta suspensión y se diseminó en la superficie del agar, luego se procedió a colocar los discos de antimicrobianos con la ayuda de una pinza y haciendo un poco de presión. Los agentes antimicrobianos seleccionados fueron los siguientes: cefoperazona (75 µg), aztreonam (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), imipenem (10 µg), amikacina (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftazidima (30 µg). Todos de la misma casa comercial, estas placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, en condiciones de aerobiosis y, posteriormente, se midieron los halos de inhibición y se clasificaron en las categorías establecidas por el CLSI 2007 en sensible (S), intermedio (I) y resistente (R).

## **Antagonismo bacteriano**

Una vez identificadas las cepas pertenecientes al género *Klebsiella*, se procedió a la detección del efecto antagónico de las bacteriocinas producidas por aislados de *Klebsiella* sp., siguiendo la metodología de doble capa descrita por Dopazo *et al.* (1988) (APÉNDICE 1).

Las cepas identificadas como *Klebsiella* se enfrentaron a cepas indicadoras provenientes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM):



*Bacillus subtilis* CVCM 591, *E. coli* K-12 CVCM 178, *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 787 y *Staphylococcus aureus* CVCM 636; como control positivo de emplearon cepas productoras de bacteriocinas provenientes del CVCM: *K. pneumoniae* CVCM 797, *K. pneumoniae* CVCM 799 y *K. pneumoniae* CVCM 800.

Posteriormente, se enfrentaron con cuatro cepas de diferentes géneros (*Shigella* sp., *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp.), provenientes del cultivo de las muestras de agua del río Manzanares.

El procedimiento fue realizado de la siguiente manera:

Las cepas en estudio se inocularon en agar LB y se incubaron a 32°C, de 18- 24 horas en condiciones de aerobiosis, luego se resuspendió la respectiva cepa en 5 ml de caldo LB en una concentración de 0,5 de la escala de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml); después, se inocularon 10 µl de la cepa de *Klebsiella* sp., en estudio, en una zona específica de una placa con agar LB y se incubaron a 32°C de 18-24 horas, en condiciones de aerobiosis. Transcurrido el tiempo de incubación, los inóculos de *Klebsiella* sp., fueron expuestos por 20 minutos a vapores de cloroformo, para luego cubrirse con 10 ml de agar LB a 42°C, inoculado con 0,5 ml de cultivo fresco de las bacterias indicadoras provenientes del CVCM y con otras enterobacterias aisladas de las muestras de agua del río Manzanares; las placas con la doble capa de agar se incubaron a 32°C por 24 horas, en condiciones de aerobiosis. Cumplidas las 24 horas de incubación, se observó la formación o no de halos de inhibición de crecimiento bacteriano, alrededor de la zona donde se encontraba el inóculo de *Klebsiella* sp. Los resultados de producción del efecto antagónico se interpretaron basándose en la formación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano de cualquier tamaño.

### **Concentración mínima inhibitoria**

Se utilizó el método de dilución en agar Mueller Hinton, siguiendo los lineamientos del Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, 2007), empleando los siguientes antibióticos: cefoperazona (75 µg), aztreonam (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), imipenem (10 µg), amikacina (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftazidima (30 µg).

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se emplearon tablas, en las cuales fueron plasmados los resultados. Los patrones de susceptibilidad antimicrobiana se expresaron en porcentajes, bien sea de resistencia o sensibilidad (Sokal y Rohlf, 1981).

## RESULTADOS

En la tabla 1 de acuerdo al conteo de colonias realizado a las diluciones de las muestras de agua, para cada una de las cuencas del río Manzanares, se pudo observar que la cuenca baja presentó el conteo bacteriano más alto, con un rango de  $1,40 \times 10^5$  -  $1,80 \times 10^5$  UFC/ml; para la cuenca media el rango fue de  $0,95$  -  $1,20 \times 10^5$  UFC/ml, siendo este muy similar al presentado por la cuenca baja cuyo rango osciló de  $0,70$  -  $1,00 \times 10^5$  UFC/ml. Según lo estipulado en la norma salvadoreña, sobre parámetros de la calidad de agua (NSO) (2001), los límites de permisibilidad para bacterias heterótrofas no deben exceder la 100 UFC/ml.

Tabla 1. Conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), en las diferentes cuencas del río Manzanares, estado Sucre.

Cuenca	Meses			Rango (UFC/ml)
	Febrero (UFC/ml)	Mayo (UFC/ml)	Agosto (UFC/ml)	
Cuenca baja	$1,80 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$	$1,40 \times 10^5$	$1,40 - 1,80 \times 10^5$
Cuenca media	$1,20 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$0,95 \times 10^5$	$0,95 - 1,20 \times 10^5$
Cuenca alta	$1,00 \times 10^5$	$0,80 \times 10^5$	$0,70 \times 10^5$	$0,70 - 1,00 \times 10^5$

UFC/ml: unidades formadoras de colonias por mililitro

En la tabla 2 se observa la variedad de géneros bacterianos encontrados en las cuencas del río Manzanares; estos microorganismos poseen la capacidad de colonizar casi todos los ambientes, pudiéndose aislar tanto en el suelo como en el agua. El microorganismo más predominante fue *Staphylococcus* sp., con un predominio de 28,71%; seguido del género *Aeromonas*, con un 20,79%, así mismo, el género *Pseudomonas* tuvo un porcentaje de aislamiento en este estudio de 15,84%. También se pudo observar que estos tres géneros bacterianos junto con la especie *Enterobacter cloacae*, *K. ozaenae* y *K. planticola*, se aislaron en las tres cuencas en estudio.

Tabla 2. Diversidad de especies bacterianas aisladas en las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.

Microorganismo	N	%	Cuencas
<i>Aeromonas</i> sp.	21	20,79	CB, CM, CA
<i>BGNNF</i>	12	11,88	CB, CM, CA
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	0,99	CM
<i>E. cloacae</i>	8	7,92	CB, CM, CA
<i>Escherichia coli</i>	5	4,95	CB, CM
<i>Staphylococcus</i> sp.	29	28,71	CB, CM, CA
<i>Klebsiella terrigena</i>	3	2,97	CM, CA
<i>K. ozaenae</i>	2	1,98	CB, CM, CA
<i>K. planticola</i>	3	2,97	CB, CM, CA
<i>Pseudomonas</i> sp.	16	15,84	CB, CM, CA
<i>Shigella</i> sp.	1	0,99	CB
Total	101	100	

BGNNF: bacilos Gramnegativos no fermentadores/ CB: cuenca baja, CM: cuenca media, CA: cuenca alta/ N: número de cepas aisladas/ %: porcentaje de cepas aisladas.

En la tabla 3 se observan los diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* aislados de las cuencas de río Manzanares; ésta refleja un predominio de 34,78% para la especie *E. cloacae* y 21,74% para la especie *E. coli*.

Se aisló un total de 8 especies bacterianas pertenecientes al género *Klebsiella*, de las cuales, 2 (8,70%) correspondieron a *K. ozaenae* y *K. terrigena* y *K. planticola* con 3 (18,70%) aislamientos cada una.

Tabla 3. Porcentaje de enterobacterias aisladas de la cuenca alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.

Microorganismo	N	%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	4,35
<i>E. cloacae</i>	8	34,78
<i>Escherichia coli</i>	5	21,74
<i>K. terrigena</i>	3	13,04
<i>K. ozaenae</i>	2	8,70
<i>K. planticola</i>	3	13,04
<i>Shigella</i> sp.	1	4,35
Total	23	100

N: número de cepas aisladas/ %: porcentaje de cepas aisladas.

En la tabla 4 se muestran los patrones de sensibilidad encontrados en los diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, se observa una marcada sensibilidad a los diferentes antimicrobianos empleados. Para cefoperazona, amikacina e imipenem, las cepas presentaron un 100,00% de sensibilidad, mientras que el 56,52% de las cepas fueron resistentes a cefalotina.

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de enterobacterias aisladas de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.

Antimicrobiano	Sensible		Intermedio		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Cefoperazona	23	100,00	0	0,00	0	0,00
Ceftazidima	22	95,96	0	0,00	1	4,35
Amikacina	23	100,00	0	0,00	0	0,00
Imipenem	23	100,00	0	0,00	0	0,00
Ciprofloxacina	16	69,57	0	0,00	7	30,43
Aztreonam	22	95,96	0	0,00	1	4,35
Cefalotina	10	43,48	0	0,00	13	56,52

N: número de cepas aisladas/ %: porcentaje de cepas aisladas.

La tabla 5 muestra los patrones de sensibilidad de las diferentes especies del género *Klebsiella* aisladas de las cuencas del río Manzanares,. Se observa que este grupo presentó resistencia solo para ciprofloxacina, (62,50%).

Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Klebsiella* sp. aisladas de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.

Antimicrobiano	Sensible		Intermedio		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Cefoperazona	8	100,00	0	0,00	0	0,00
Ceftazidima	8	100,00	0	0,00	0	0,00
Amikacina	8	100,00	0	0,00	0	0,00
Imipenem	8	100,00	0	0,00	0	0,00
Ciprofloxacina	3	37,50	0	0,00	5	62,50
Aztreonam	8	100,00	0	0,00	0	0,00
Cefalotina	8	100,00	0	0,00	0	0,00

N: número de cepas aisladas/ %: porcentaje de cepas aisladas.

La tabla 6 refleja la presencia de cinco fenotipos de susceptibilidad para las enterobacterias aisladas en las diferentes cuencas del río Manzanares, se puede observar que la mayoría de los fenotipos se inclinan a, la sensibilidad, y los mismos se distribuyeron de la siguiente manera: el fenotipo A corresponde a una cepa del género *Shigella* sp., el B está integrado por ocho cepas de *E. cloacae*, dos cepas de *E. coli* y una cepa de *E. agglomerans*; el fenotipo C fue expresado por una sola cepa de *E. coli*; el fenotipo D correspondió a dos cepas de *K. ozaenae*, una de *K. planticola* y una de *E.coli* y el fenotipo E se expresó en tres cepas de *K. terrigena*, dos de *K. planticola* y una de *E.coli*.

Tabla 6. Fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana de enterobacterias aisladas de la cuenca alta, media y baja del río Manzanares, estado Sucre.

Fenotipo	N	%	CFP	CAZ	AN	IMP	CIP	ATM	CF
A	1	4,35	S	R	S	S	S	R	R
B	11	47,83	S	S	S	S	S	S	R
C	1	4,35	S	S	S	S	R	S	R
D	4	17,39	S	S	S	S	S	S	S
E	6	26,09	S	S	S	S	R	S	S

CFP: cefoperazona, CAZ: ceftazidima, AM: amikacina, IMP: imipenem, CIP: ciprofloxacina, ATM: aztreonam, CF: cefalotina/ N: número de cepas aisladas/ %: porcentaje de cepas aisladas.

La concentración inhibitoria minima para las cepas del género *Klebsiella*, aisladas de las cuencas del río Manzanares, que presentaron resistencia a ciprofloxacina se realizó a una concentración de 0,5 µg/ml hasta 128 µg/ml de este antimicrobiano, observándose crecimiento hasta la concentración de 4 µg/ml.

Las cepas de *Klebsiella* aisladas de las diferentes cuencas del río Manzanares no expresaron producción de bacteriocinas, sin embargo, se pudo evidenciar la inhibición de la cepa indicadora de *E. coli* K12 CVCM 178, al enfrentarla con *K.pneumoniae* CVCM 797 productora de bacteriocina, la cual fue empleada como control, tal como lo muestra la figura 2.

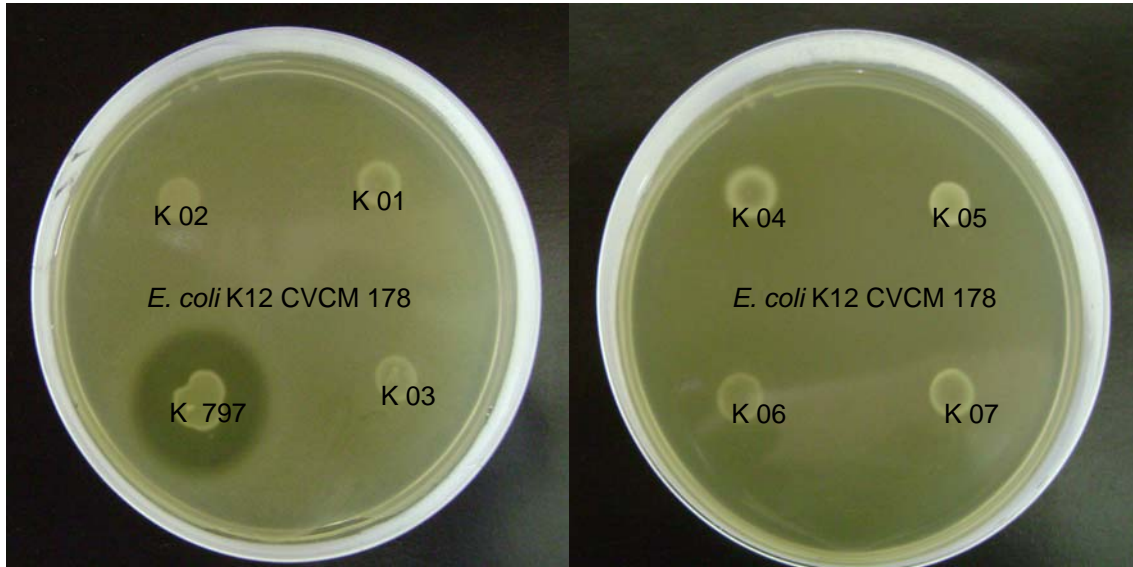


Figura 2. *K. pneumoniae* CVCM 797 productora de bacteriocina, contra *E. coli* K12 CVCM 178. Cepas de *Klebsiella* (K01- K07) no productoras de bacteriocinas, aisladas de las cuencas del río Manzanares.

## DISCUSIÓN

La colonización de los ríos por parte de bacterias patógenas, se debe en su mayoría a la intensa actividad antropogénica que se lleva a cabo en sus cercanías. Bacterias del grupo denominado coliforme se aíslan normalmente de estas fuentes de agua; sin embargo, un gran número de bacterias patógenas, tales como *Pseudomonas*, *Aeromonas* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *E. coli* y *Staphylococcus* sp., causantes de enfermedades son descargadas a diario, representando un riesgo para la salud (Cortés, 2003; Álvarez *et al.*, 2004). Fernández, en 1984, aisló géneros bacterianos similares a los hallados en este estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos, con relación a la biodiversidad de especies bacterianas, se observó una situación similar con un estudio realizado en varios ríos de México, en los cuales se encontró un alto porcentaje de aislamientos de bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus*, así como también, de *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* sp., *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. (Rodríguez y Botello, 1987; Quiñones *et al.*, 2000). La elevada presencia de bacterias del género *Staphylococcus* y *Aeromonas* que se determinó en esta investigación puede, deberse a las características particulares de la cuenca baja del río Manzanares, que por estar cerca de la costa marina, presenta un alto grado de salinidad y las bacterias de este género son capaces de sobrevivir en estos ambientes (Muñoz *et al.*, 2008).

Con respecto a la presencia de la familia *Enterobacteriaceae* en las diferentes estaciones, fue levemente menor en comparación con los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), cabe destacar que al ser estos últimos de distribución cosmopolita y presentar tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas, pueden ser aislados con mucha frecuencia de tierra, agua, plantas, animales y seres



humanos y aunque numerosos trabajos reportan a las enterobacterias como los de mayor frecuencia de aislamientos en aguas de ríos (Emiliani y González 1997; Lösch *et al.*, 2004, Rivera *et al.*, 2004; Rivera y Cedillo, 2005), no fue el caso de este estudio.

Rodríguez *et al.* (2002), en un estudio sobre incidencia y sensibilidad bacteriana en el río Tambre, España, encontraron una alta prevalencia de bacterias de género *Pseudomonas* y *Aeromonas*. La presencia estos dos géneros en gran número en las aguas del río Manzanares obedece a la capacidad que tienen ambos de colonizar en agua dulce y salada (Miravet *et al.*, 1992; Conde *et al.*, 2002); de igual manera, Sotomayor *et al.* (2006), en un estudio similar, reportan una alta incidencia para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia coli*; este grupo de bacterias entéricas son aisladas comúnmente de las aguas de los ríos representado al grupo de coliformes totales y fecales que son usadas para determinar los niveles de contaminación y evaluar la calidad de las aguas (Fuentes *et al.*, 2008).

La presencia de estos géneros bacterianos y su alta densidad indica niveles por encima de los límites legales, la proliferación de estas bacterias patógenas está favorecida por el incremento de la temperatura, la abundancia de nutrientes y el aumento de las descargas de materia orgánica, lo que ha ocasionado un deterioro del estado de las aguas del río Manzanares y desmejora en la calidad ambiental; esto pone en evidencia que estas aguas no son aptas para el contacto humano (Márquez *et al.*, 2002; Fuentes *et al.*, 2008).

En lo que se refiere a los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana para las bacterias aisladas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, se reportó para cefoperazona, amikacina e imipenen un 100% de sensibilidad, seguido de ceftazidima

y aztreonam con un 95,96% de cepas sensibles para ambos. Un 69,57% a ciprofloxacina y 43,48% a cefalotina. Resultados estos, muy parecidos a los obtenidos por Rodríguez *et al.* (2002), al evaluar los índices de resistencia de enterobacterias y otras bacterias Gramnegativas aisladas de río Tambre en España, reportando para cefalotina el menor porcentaje de sensibilidad del grupo de antimicrobianos y porcentajes similares de sensibilidad para el resto. Así mismo, Zambrano *et al.* (2002), evaluaron la resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales y tratadas, encontrando para el grupo de antimicrobianos usados sensibilidad para la mayoría de ellos. Aunque se observa un predominio hacia la sensibilidad, ciertas bacterias expresaron resistencia, esto puede deberse a la gran cantidad de metales pesados y agentes antimicrobianos que se vierten a los ríos por medio de los desechos humanos y animales, lo que ha permitido que las bacterias adquieran resistencia; de igual manera, las mutaciones ocasionadas por la presión selectiva a la que son sometidas las bacterias cuando están en contacto con estas sustancias, pueden desencadenar en éstas nuevos mecanismos de resistencia (Lösch *et al.*, 2004).

En cuanto a los niveles de susceptibilidad para las bacterias de género *Klebsiella*, éstas mostraron resistencia en un 62,50% a ciprofloxacina, y fueron 100% sensibles al resto de los antimicrobianos. Harris *et al.* (1999), en un trabajo sobre evolución de la resistencia a ciprofloxacina, describen porcentajes de resistencia a este antimicrobiano de amplio espectro que va en aumento con el pasar del tiempo, al ser este un antimicrobiano de primera línea para tratar la mayoría de las infecciones bacterianas, sobre todo las causadas por enterobacterias, sin tomar en cuenta la susceptibilidad en estudios previos, así mismo Lepe *et al.* (2003), indican que esta falta de sensibilidad puede deberse al uso indiscriminado de este antimicrobiano en los alimentos para uso animal, sobre todo en aves de corral.

Los diferentes fenotipos de resistencia antimicrobiana expresados por el grupo de enterobacterias aisladas de las cuencas del río Manzanares, se inclinan a hacia la sensibilidad, correspondiéndose con los encontrados por Crespo (2002) y Zambrano *et al.* (2002); esta sensibilidad puede deberse al hecho de ser bacterias aisladas de ambientes naturales, en donde la cantidad de antimicrobianos a los que se encuentran expuestas no es tan elevada como la encontrada en ambientes hospitalarios, tal como lo demuestran numerosos trabajos en los cuales la totalidad de las bacterias estudiadas presentan resistencia a la mayoría de los antimicrobianos empleados (Fajardo *et al.*, 2000; Gobernado, 2003; Álvarez *et al.*, 2005).

Crespo (2002) describe para bacterias del género *Klebsiella* de naturaleza silvestre, un fenotipo de sensibilidad similar al expresado por las cepas de *Klebsiella* en este estudio (fenotipo D) en el cual se observa un 100,00% de sensibilidad de las cepas para el grupo de antimicrobianos usados. En otro estudio, Martínez *et al.* (2005), también hallaron cepas de *K. pneumoniae* con este mismo fenotipo; esto es observado en bacterias que no han estado en contacto con antimicrobianos o solo en pequeñas proporciones y, por lo tanto, no han desarrollado mecanismos de resistencia (Cáceres *et al.*, 1998).

La concentración inhibitoria mínima de 4 µg/ml para CIP, encontrada en los aislados de *Klebsiella*, representa la cantidad necesaria de este antimicrobiano para inhibir a estas cepas de *Klebsiella* (Sánchez y Feris, 1993), valores que se corresponden con los expresados en las pruebas de susceptibilidad en disco para este mismo antimicrobiano.

En cuanto a la producción de bacteriocinas, de las 8 cepas de *Klebsiella* aisladas, ninguna presentó producción de bacteriocinas, debido a que no todas las bacterias son capaces de producir esta sustancia, tal como lo revela en Venezuela,

Rodríguez (1980), con hallazgos de cepas productoras entre 30-50%. De igual manera, Pineda y Rodríguez (1990), en un estudio sobre producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antimicrobianos en cepas de *E. coli*, aisladas de cerdos con diarrea, encontraron que de un total de 24 cepas analizadas, solo un 21% presentó producción de bacteriocinas.

La producción de bacteriocinas por parte de bacterias de género *Klebsiella*, ha sido descrita en varios trabajos para las especies *K. pneumoniae* y en algunos casos para *K. oxytoca* (Banerjee *et al.*, 1993; Aggarwal *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 2003); en el río Manzanares los aislados de *K. terrigena*, *K. planticola* y *K. ozaenae* no expresaron la producción de bacteriocinas.

Así mismo, Harnett y Gyles (1984), Finola *et al.* (1989), Pineda y Rodríguez (1990) y Karama *et al.* (2008), en sus trabajos sobre cepas productoras de bacteriocinas, encontraron un alto porcentaje de resistencia hacia los antimicrobianos usados en las cepas productoras, hallando en algunos casos multiresistencia en las cepas positivas para bacteriocinas, lo que sugiere una relación entre la producción de bacteriocinas y la resistencia antimicrobiana.

D'Aguila (1996), comprobó que *Pseudomonas* era capaz de inhibir el crecimiento de los coliformes, Marchand (2002), reportó que especies del género *Pseudomonas* producen una sustancia denominada "Pseudocin" (PLS) que inhibe el crecimiento de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella* sp., que pudiera estar inhibiendo en las aguas del río Manzanares a bacterias de género *Klebsiella*.

De igual modo, se ha comprobado que la producción de bacteriocinas por parte de bacterias del género *Pseudomonas*, producen una acción antibiótica frente a

diversos géneros bacterianos como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp *Proteus* sp, *S. aureus*, *Shigella* sp., entre otros (Iwalokun *et al.*, 2006).

Es importante destacar que no todos los aislados de *Klebsiella* son capaces de producir sustancias antagónicas, así como también, otros aspectos metodológicos que pudieran influir en la expresión o producción de estas sustancias, tales como condiciones de pH, medios de cultivo, sustratos, entre otros, por lo que es conveniente emplear otras técnicas que permitan evidenciar esta característica.

## CONCLUSIONES

Los elevados niveles bacterianos y la presencia de géneros altamente patógenos en las aguas del río Manzanares, son indicativos de que éstas no se encuentran aptas para el consumo humano, ya que sobrepasan los índices de permisibilidad.

El grupo de bacterias encontradas presentaron un alto porcentaje de sensibilidad a los antimicrobianos empleados.

La resistencia mostrada a ciprofloxacina por ciertas bacterias del género *E. coli* y *Klebsiella* aisladas en este estudio, indica el uso indiscriminado que se le ha dado a este medicamento como tratamiento de primera línea para todo tipo de infecciones.

Las cepas del género *Klebsiella* aisladas del río Manzanares, no mostraron la capacidad de producir bacteriocinas.

## **RECOMENDACIONES**

En vista de los resultados obtenidos, es conveniente el empleo de otras técnicas más sensibles para la detección de bacteriocinas, así como tomar en cuenta factores como temperatura, sustratos, pH, medios de cultivo, entre otros que puedan interferir en la expresión de las mismas.

## BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, A.; Khanna, S. y Arora, U. 2003. Characterisation, biotyping, antibiogram and klebocin typing of *Klebsiella* with special reference to *Klebsiella oxytoca*. *Indian. J. Med. Sci.*, 57: 68-70.

Álvarez, E.; Espino, M.; Contreras, R. y Álvarez, A. 2005. Evaluación de la resistencia a los antimicrobianos por el sistema DIRAMIC. *Rev. Panam. Infectol.*, 7: 28-32.

Álvarez, J.; Arguto, A. y Obregón, J. 2004. Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. *Rev. Cient.*, 14: 491-499.

Andrade, V. y Silva, J. 2004. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Sal. Pub. Mex.*, 46: 524-528.

Banerjee, M.; Sahu, K.; Bhattacharya, S.; Adhya, S.; Bhowmick, P. y Chakraborty, P. 1993. Outbreak of neonatal septicemia with multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Indian. J. Pediatr.*, 60: 25-27.

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

Benítez, S. 2004. Determinación de la carga orgánica impuesta al río Manzanares en el periodo febrero-junio 2004. Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Instituto Universitario de Tecnología, Cumaná.

Braun, V.; Pils, H. y Gro, P. 1994. Colicins: structures, modes of actions, transfer through membranas, and evolution. *Arch. Microbiol.*, 161: 199-206.

Cáceres, M.; Carera, E.; Palmgren, C. y Nord, C. 1998. Sensibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias aisladas de la flora intestinal de niños tratados con antimicrobianos en Nicaragua. *Soc. Esp. Quimioterap.*, 11: 221-228.

Cascales, E.; Buchanan, S.; Duché, D.; Kleanthous, C.; Lloubès, R.; Postle, K.; Riley, M.; Slatin, S. y Cavard, D. 2007. Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 158-229.

Castillo, A. 1979. Espectro heterólogo de las bacteriocinas de *Klebsiella*



*pneumoniae*.<[http://www.cibernetia.com/tesis\\_es/CIENCIAS\\_DE\\_LA\\_VIDA/MICROBIOLOGIA/BACTERIOLOGIA/13](http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/MICROBIOLOGIA/BACTERIOLOGIA/13)>(23/08/2007).

Chaves, J. 2002. "Caracterización molecular del gen de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae*". Trabajo para ascender a la categoría de Doctor. Departamentos de Microbiología y Farmacia, Universidad de Barcelona, España.

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

Conde, M.; García, F.; Sieiro, C.; Rodríguez, L. y Rodríguez, L. 2002. Estudio microbiológico de la supervivencia y estado activo no cultivable de especies de la familia *Vibrionaceae*. *Bol. Soc. Esp. Hidrol. Med.*, 1: 35-41.

Cortés, M. 2003. Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. *Rev Biomed.*, 14: 121-123.

Crespo, M. 2002. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colomb. Med.*, 33: 179-193.

D'Aguila, P. 1996. *Pseudomonas aeruginosa* como indicador en análisis bacteriológicos de aguas de abastecimiento público. Maestría en Salud Pública. Escuela Nacional de Salud Pública. Río de Janeiro. Brasil.

De la Parte, M.; Brito, A. y Guzman, M. 2001. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela: Análisis de una década. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 21: 14-22.

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

Emiliani, F. y González, S. 1997. Bacterias coliformes en ambientes acuáticos no contaminados del río Paraná medio (Santa Fe, Argentina): distribución y correlación con variables ambientales. *FABICIB.*, 1: 39-51.

Fajardo, A.; Colombet, M.; Herrera, A.; Verde, J. y Miranda, Z. 2000. Resistencia antimicrobiana de bacterias Gramnegativas en la UCI. *Med. Crit. Venez.*, 16: 22-25.

Fernández, E. 1984. Contaminación de los ríos Guasdua y Manzanares, edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Ven.*, 23: 113-128.

Finola, M.; Moyano, S. y Albesa, I. 1989. Klebocinas K6 y K150: producción y actividad en diferentes condiciones experimentales / Klebocins K6 y K150: production and activity in various experimental conditions. *Rev. Argent. Microbiol.*, 21: 31-35.

Freeman, B. 1986. *Microbiología de Burrows*. Vigésima segunda edición. Editorial Interamericana. Barcelona.

Fox, A. 2006. "Enterobacterias, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Helicobacter*". <<http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter11.htm>> (25/02/2007).

Fuentes, M.; Senior, W.; Fermin, Ivis. y Troccoli, L. 2008. Estudio fisicoquímico y bacteriológico del río Manzanares, Estado Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Ven.*, 47: 149-158.

García, F. 2001. Resistencia bacteriana a antibióticos. *Acta Med. Costarric.*, 3: 101-102.

Gobernado, M. 2003. Reflexiones sobre resistencia bacteriana. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 16: 158-160.

Harnett, N. y Gyles, C. 1984. Resistance to drugs and heavy metals, colicin production and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Appl. Env. Microbiol.*, 48: 930-935.

Harris, B.; Castellano, M. y Ginestre, M. 1999. Evolución de la resistencia a ciprofloxacina y otras quinolonas en bacterias clínicamente significantes. *Kasmera*, 27: 161-179.

Hentz, C.; Bono, M.; Barros, F. y Lagos, R. 2002. Microcin E492, a channel forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 2696-2701.

Huang, H.; Gong, C. y Tsao, G. 2002. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98: 687-698.

Izquierdo, L. 2003. Biosíntesis del lipopolisacárido de "*Klebsiella pneumoniae*". Trabajo para ascender a la categoría de Doctor. Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, España.

Iwalokun, B.; Akinsinde, K.; Lanlenhin, O. y Onubogu, C. 2006. Bacteriocinogenicity and production of pyocins from *Pseudomonas* species isolated in Lagos, Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.*, 5: 1072-1077.

- Karama, M.; Johnson, R.; Holtslander, R. y Gyles, C. 2008. Phenotypic and genotypic characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 Isolates from cattle and humans. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 3569-3575.
- Koneman, E.; Stephen, A.; Janda, W.; Schreckemberger, P. y Washington, W. 2004. *Diagnóstico microbiológico*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Bogotá.
- Lepe, J.; Garrido, A. y Guerrero, F. 2003. Sensibilidad reducida a ciprofloxacino en los aislados de *Salmonella* entérica de la zona norte de Huelva. *Rev. Esp. Sal. Pub.*, 77: 761-764.
- Lösch, L.; Merino, L. y Alonso, J. 2004. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco. *Inst. Med. Reg.*, 2: 43-50.
- Malik, A.; Hasani, S.; Shahid, M.; Khan, H. y Ahmad, A. 2003. Nosocomial *Klebsiella* infection in neonates in a tertiary care hospital: protein profile by SDS-page and klebocin typing as epidemiological markers. *Indian. J. Med. Microbiol.*, 21: 82-86.
- Marchand, E. 2002. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana. Trabajo de pregrado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Márquez, A.; Martínez, G. y Senior, W. 2002. Environment al conditions of the Waters of the Manzanares river, Cumana–Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Ven.*, 41: 15-24.
- Márquez, A.; Senior, W. y Martínez, G. 2000. Concentración y comportamiento de metales pesados en una zona estuariana de Venezuela. *Interciencia*, 25: 284-291.
- Martínez, P.; Espinal, P.; Bustos, A. y Mattar, S. 2005. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Med. UNAB.*, 8: 15-22.
- Milne, D. 1989. Share base microbiological sampling of recreational bathing water. Possible problem and solutions. *Wat. Shed.*, 11: 331-333.
- Miravet, M.; Lugioyo, G.; Rodriguez, F. y Bellota, M. 1992. Bacterias marinas aisladas del Golfo de Batabanó. *Sw. Cub. Rep. Inv.*, 11: 11-11.
- Mulusky, D. 1974. *Ecology of estuaries*. Heineman Educational Books. London.

Muñoz, D.; Grau, C. y Martínez, C. 2008. Prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. y enterobacterias en carne de pepitona, *Arca zebra*, comercializada en Cumaná, Venezuela. *Zootec. Trop.*, 26: 505-513.

Norma salvadoreña (NSO). 2001. Parámetros de la calidad de agua. Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-COCACYT., 99:3-2.

Ocaña, A.; Rocchi, M.; Gasparotto, A.; Conrero, I.; Navarro, M.; Factorovich, S.; Albrecht, C. y Monterisi, A. 2007. Bacteremia por enterobacterias en adultos en un hospital universitario: análisis de cinco años. *Rev. Arg. Microbiol.*, 39: 38-43.

Paz y Miño, M.; Barzola, C.; Lazcano, C.; Ponce, M. y León, J. 2003. Colifagos como indicadores de contaminación fecal y de remoción bacteriana en la potabilización del agua. *Rev. Peru. Biol.*, 10: 133-144.

Pineda, Y. y Rodríguez, V. 1990. Producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* de cerdos con diarrea. *Vet. Trop.*, 15: 87-98.

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

Quiñones, E.; Vasquez, C.; Pedroche, F.; Moreno, L. y Rodas, O. 2000. Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella* y detección de coliformes fecales en almejas del golfo de México. *Hidrobiol.*, 10: 131-138.

Rivera, N.; Encina, F.; Muñoz, A. y Mejias, P. 2004. La calidad de las aguas en los ríos Cautín e Imperial, IX región Chile. *Inf. Tecnol.*, 15: 89-101.

Rivera, J. y Cedillo, L. 2005. Evaluación de la resistencia a antibióticos en enterobacterias aisladas de aguas contaminadas. *Rev. Biomed.*, 16: 151-152.

Rodríguez, A.; Díaz, M.; Gómez, M.; Araujo, M. y Garrido, M. 2002. Incidencia y sensibilidad de la población microbiana aerobia en el Río Tambre. <[http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/antibio\\_coruna.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/antibio_coruna.pdf)> (15/04/2009).

Rodríguez, S. y Botello, A. 1987. Contaminación de enterobacterias en la red de agua potable y en algunos sistemas acuáticos del sureste de México. *Contam. Amb.*, 3: 37-53.

Rodríguez, V. 1980. Reducción de la sensibilidad a la colicina B en cepas de *E. coli* K12 portadoras de plásmidos del grupo de incompatibilidad S. *Acta. Cient. Venez.*, 31: 561-565.

Rosas, I.; Yela, A.; Salinas, E. y Calva, E. 1994. Bacterias entéricas en la atmósfera. *Ciencia y Desarrollo*, 20: 27-52.

Sánchez, J. y Feris, J. 1993. Antibiogramas: Utilidad y limitaciones. *Arch. Dom. Ped.*, 34: 83.87.

Sánchez, M. 2006. Caracterización de variantes de la enterocina AS-48 obtenidas mediante mutagénesis dirigida. Trabajo para ascender a la categoría de Doctor. Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, España.

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

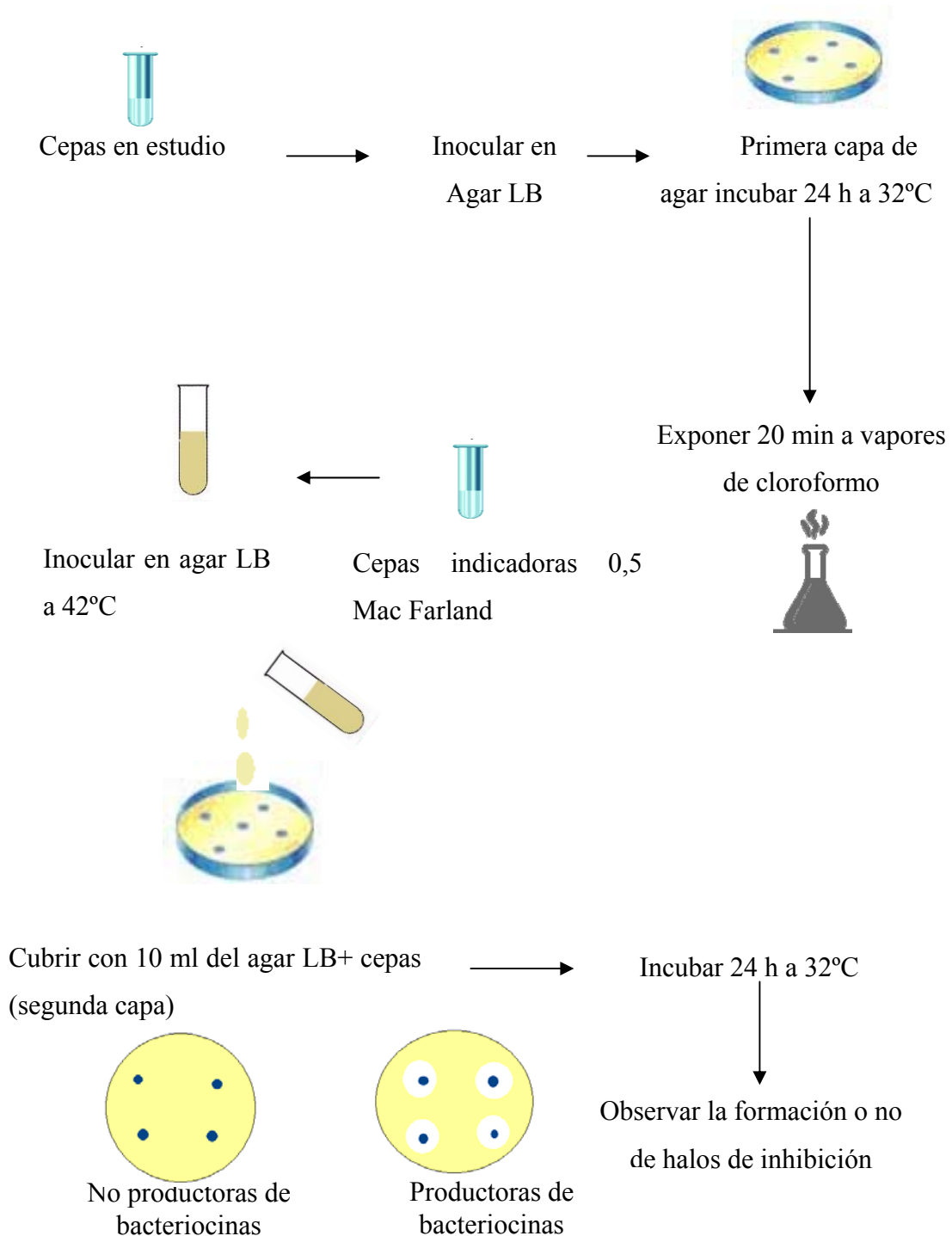
Sotomayor, D.; Alameda, M.; Martínez, G.; Pérez, L. y Corvera, R. 2006. Microbiological surface-water quality of the Rio Grande watershed, Puerto Rico. *Caribbean. J. Sci.*, 42: 151-163.

Zambrano, J.; Botero, L.; Cavazza, M. y Avila, M. 2002. Resistencia a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas residuales crudas y tratadas por lagunas de estabilización con fines de reuso en agricultura. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 22: 44-50.

## **APÉNDICE**

# APÉNDICE 1

## METODOLOGÍA DE DOBLE CAPA



## HOJAS DE METADATOS

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

<b>Título</b>	Bacteriocinas producidas por aislados ambientales de <i>Klebsiella</i> sp. provenientes de las cuencas alta, media y baja del Río Manzanares, Estado Sucre
<b>Subtítulo</b>	

#### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
Pérez J., Patricia L.	<b>CVLAC</b>	16314460
	<b>e-mail</b>	patrilorenaj@hotmai.com
	<b>e-mail</b>	

#### Palabras o frases claves:

Bacteriocinas, <i>Klebsiella</i> sp., Río Manzanares.
---



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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la producción de bacteriocinas en bacterias pertenecientes al género *Klebsiella*, aisladas de muestras de agua provenientes de las cuencas alta, media y baja del río Manzanares del estado Sucre. Para la identificación de las cepas se realizó la caracterización, tanto macroscópica como microscópica, de las colonias de interés, así como, también pruebas bioquímicas convencionales; las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron por el método de difusión en agar, la producción de bacteriocinas se realizó aplicando la técnica de doble capa en agar LB, y se emplearon como cepas indicadoras tales como: *B. subtilis* CVCM 591, *E. coli* K-12 CVCM 178, *P. aeruginosa* CVCM 787 y *S. aureus* CVCM 636 y, además, cepas de otros géneros provenientes del río. Se aisló un total de 101 cepas bacterianas, de las cuales, 29 se identificaron como *Staphylococcus*, 21 *Aeromonas*, 23 pertenecieron a la familia *Enterobacteriaceae*, 16 *Pseudomonas* y 12 BGNNF. De las cepas de enterobacterias, 8 correspondieron al género *Klebsiella*. 56,52% de las cepas de enterobacterias resultaron resistentes a cefalotina; 30,43% a ciprofloxacina, un y 4,35% a ceftazidima y aztreonam, respectivamente; Para cefoperazona, imipenem y amikacina las cepas presentaron un 100% de sensibilidad. Ninguna de las especies de *Klebsiella* estudiadas presentaron producción de bacteriocinas al hacerla actuar contra cepas indicadoras y con algunas de las aisladas del río, solo las cepas controles (*K. pneumoniae* CVCM 797, *K. pneumoniae*, CVCM 799 y *K. pneumoniae* CVCM 800), presentaron efecto antagónico contra las cepas indicadoras; esto pudo deberse a que esta característica es expresada en su mayoría por la especie *K. pneumoniae*, las cuales no fueron halladas en la investigación.

---

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

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
Yasmina Araque	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input checked="" type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail	yamasi40@hotmail.com			
	e-mail				
Sara Centeno	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				
Hernando Herrera	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	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_PP.doc	Aplication/Word

### Alcance:

**Espacial :**                      Universal                      (Opcional)

---

**Temporal:**                      Intemporal                      (Opcional)

---

### Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Bioanálisis

---

**Nivel Asociado con el Trabajo:**    Licenciatura

---

### Área de Estudio:

Bioanálisis

---

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

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre

---

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

**Derechos:**

**Para publicar título y resumen únicamente en la página web.**

---

*Patricia Pérez*

**AUTOR 1**

*Josef*  
**TUTOR**

*Francisco*  
**JURADO 1**

*Guillermo*  
**JURADO 2**

**POR LA COMISIÓN DE TESIS:**

*[Signature]*

