

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Aislamiento y Caracterización de Bacterias

Se buscó aislar y recolectar bacterias conocidas por su capacidad generadora de biopelículas tales como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Haemophilus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Actinomyces sp.*, *Aeromonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Vibrio sp.* y *E. coli*; a partir de muestras clínicas.

Las muestras se sembraron en medios selectivos y no selectivos para el aislamiento e identificación de las bacterias, tales medios fueron Gelosa Sangre, Agar Sal y Manitol y Agar Mac Conkey incubados a 37°C durante 24 horas. La identificación del género y especie bacteriana se realizó a través de las características morfológicas, la observación microscópica utilizando la tinción de Gram (cristal violeta 1 min, yodo-lugol 1 min, alcohol-cetona 10 seg y rojo de safranina 30 seg) y pruebas bioquímicas para Gram positivos y Gram negativos (TSI, LIA, MIO, Citrato de Simmons, Rojo de Metilo-Voges Proskauer, reducción de Nitratos y prueba de oxidasa). Para su conservación las cepas aisladas fueron sembradas en Tripticasa Soya Agar (TSA) y refrigeradas a 4°C.

II. Curva de Crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento bacteriano para determinar el tiempo de generación y el tiempo de incubación adecuado para cada microorganismo. Se preparó una suspensión en solución salina correspondiente a 1×10^4 UFC/ml de cada bacteria, se tomaron 20 µl de dicho inóculo y se transfirieron a la microplaca que contenía 180 µl del caldo Infusión Cerebro-

Corazón (BHI). Se incubó a 37°C durante 24 horas y se realizaron lecturas de la absorbancia a 630 nm cada hora en el Lector de Absorbancias BioTek® ELx800.

III. Formación de Biopelículas

Para la evaluación de la capacidad de las bacterias para formar biopelículas se utilizó un método cuantitativo (superficie de polietileno) y un método semi-cuantitativo (superficie de vidrio). En ambos casos se prepararon inóculos de cada bacteria de 60 millones UFC/ml (D.O. 0.2) y 90 millones UFC/ml (D.O. 0.3) correspondientes a la escala de MacFarland. La prueba cuantitativa se realizó en microplacas donde cada pozo contenía 180 µl de caldo BHI que fueron inoculados con 20 µl de las suspensiones bacterianas, se incubaron durante 12, 24 y 48 horas a dos temperaturas 37°C y 25°C; posterior al tiempo de incubación, se realizó un tratamiento para teñir las biopelículas con 200 µl de cristal violeta por 5 min, 3 lavados con agua destilada para retirar el exceso de colorante y 180 µl de alcohol-cetona por 10 min, finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 630 nm; como controles se utilizaron 3 pocillos con 200 µl de caldo BHI sometidos al mismo tratamiento.

En la prueba semi-cuantitativa se utilizaron tubos de vidrio con tapón de rosca que contenían 5 ml de caldo BHI inoculados con 50 µl de las suspensiones bacterianas incubados durante 12, 24 y 48 horas también a 37°C y 25°C, se tiñeron los tubos con 4 ml de cristal violeta durante 10 min y se enjuagaron con agua destilada para remover el exceso de colorante y se observó la formación de las biopelículas en las paredes del tubo; los controles fueron tubos de vidrio que contenían 5 ml de caldo BHI incubados y sometidos al mismo tratamiento que los de las muestras bacterianas.

IV. Caracterización de Sideróforos

La caracterización de sideróforos se llevó a cabo a través de métodos espectrofotométricos utilizando el espectrofotómetro Varian Cary® 100 UV-Vis. Se prepararon soluciones individuales de cada bacteria con un ml del inóculo y 3 ml de FeCl₃ al 2%, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 495 nm para el caso de los catecolatos y entre 420 y 450 nm para los hidroxamatos. Para la detección de carboxilatos se utilizó un ml del sobrenadante, 2 ml de CuSO₄ 250 µM y 2 ml de buffer acetato a pH 4 y se midió la absorbancia entre 190 y 280 nm.

V. Disponibilidad de Hierro y Capacidad de Formación de Biopelículas

La capacidad para formar biopelículas a través de la disponibilidad de hierro se analizó mediante la adición de soluciones de FeCl₃ con diferentes concentraciones (50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µM). Se utilizó una microplaca de 96 pozos en los cuales el volumen final correspondió a 200 µl de los cuales 20 µl eran del inóculo de la bacteria de 1x10⁵ UFC/ml 90 µl de caldo BHI y 90 µl de la solución de FeCl₃ 1000 µM, para el resto de los pocillos con concentraciones menores de FeCl₃ se realizaron las diluciones correspondientes a cada concentración; como controles se utilizaron las mismas soluciones de FeCl₃ a ensayar adicionando caldo BHI para completar los 200 µl. Las microplacas se incubaron a 37°C durante 12, 24 y 48 horas y concluidos los tiempos de incubación se determinó su absorbancia a 630 nm.

Adicionalmente se realizó otro ensayo para evaluar la formación de biopelículas en presencia de hierro mediante la preparación de medio TSA libre de hierro (hierro quelado con EDTA disódico) al cual se le adicionó la concentración de FeCl₃ de acuerdo al ensayo

anterior. Se utilizó un inóculo de 1,500 millones UFC/ml correspondiente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland, de cada bacteria, para inocular las placas de TSA mediante la siembra masiva como en el método de Kirby-Bauer. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C. Posteriormente se realizó la evaluación de la formación de biopelículas mediante el método cuantitativo, como se describió anteriormente, utilizando en este caso caldo TSA libre de hierro y el inóculo correspondiente a cada bacteria que permitió la mejor formación de biopelículas.

VI. Análisis Estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado a través de los cuales se obtuvieron promedios y desviaciones estándar y los datos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA utilizando un nivel de significancia del 95%.