

CAPÍTULO V

RESULTADOS

I. Aislamiento y Caracterización de Bacterias

Se obtuvieron 4 cepas bacterianas distintas, 3 de ellas aisladas de muestras clínicas y la cuarta provino de una muestra ambiental. La primera muestra fue un exudado faríngeo y al microscopio se observaron cocos Gram positivo y por sus características bioquímicas de manitol positivo, catalasa positivo y coagulasa positivo se identificó como *S. aureus* (Tabla 1); la segunda muestra provino de piel e igualmente al microscopio se observaron cocos Gram positivo y su bioquímica resultó manitol negativo, catalasa positivo y coagulasa negativo lo que se identificó como *S. epidermidis* (Tabla 1). La tercera muestra provino de un aspirado bronquial en el que se observaron bacilos Gram negativo, por sus pruebas bioquímicas y su capacidad para fermentar lactosa en agar Mac Conkey se identificó como *K. pneumoniae* (Tabla 2); de la última muestra se aisló una *P. aeruginosa* de origen ambiental, que se identificó por sus pruebas bioquímicas principalmente por su capacidad no fermentadora y la producción de un pigmento verde en el agar Cetrimida (Tabla 2).

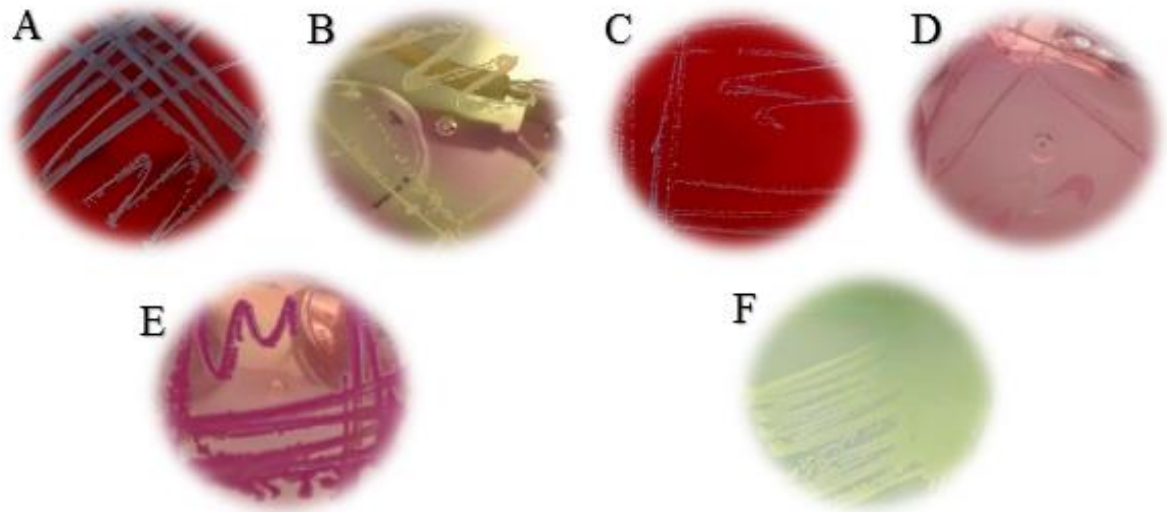


Figura 2: A) Colonias beta hemolíticas en gelosa sangre identificadas de *S. aureus*. B) *S. aureus* en agar Sal y Manitol, manitol positivo. C) Colonias alfa hemolíticas en gelosa sangre de *S. epidermidis*. D) Colonias manitol negativo de *S. epidermidis*. E) *K. pneumoniae* en agar Mac Conkey, lactosa positivo y morfología mucoide característica. F) Producción del pigmento pioverdina en agar Cetrimida característico de *P. aeruginosa*.

Tabla 1: Pruebas de identificación para cocos Gram positivo.

	Exudado Faríngeo	Piel
Gram	Positivo	Positivo
Forma	Estafilococos	Estafilococos
Gelosa Sangre	β hemólisis	α hemólisis
Manitol	Positivo	Negativo
Catalasa	Positivo	Positivo
Coagulasa	Positivo	Negativo
Bacteria	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>

Tabla 2: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos Gram negativo.

	Aspirado Bronquial	Muestra Ambiental
Gram	Negativo	Negativo
Forma	Bacilos	Bacilos
Mac Conkey	Rosa y mucoide Lac +	Incoloro Lac -
TSI	A/A gas+ H ₂ S-	K/SC No fermentador
LIA	K/K H ₂ S-	K/K H ₂ S-
MIO	M- I- O-	M+ I- O-
Citrato	Positivo	Positivo
Nitratos	OF M- N+	O M+ N+
RM-VP	RM- VP+	RM- VP-
Catalasa	Positivo	Positivo
Oxidasa	Negativo	Positivo
Cetrimida	-	Verde limón
Bacteria	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>

II. Curva de Crecimiento Bacteriano

Se realizó la curva de crecimiento de cada cepa bacteriana (Figura 3) con el fin de determinar su tiempo de generación y verificar que los tiempos de incubación propuestos en el ensayo para la formación de biopelículas sean adecuados. Se obtuvo un tiempo de generación de *S. aureus* de 6.4 horas, para *S. epidermidis* fue de 2.6 horas, *K. pneumoniae* con 3.1 horas y para *P. aeruginosa* fue de 2.3 horas; en las cuatro bacterias fue posible observar las fases lag, de crecimiento y estacionaria, alcanzando el máximo número de células a las 16 horas aproximadamente para *S. aureus* y para el resto a las 12 horas de incubación.

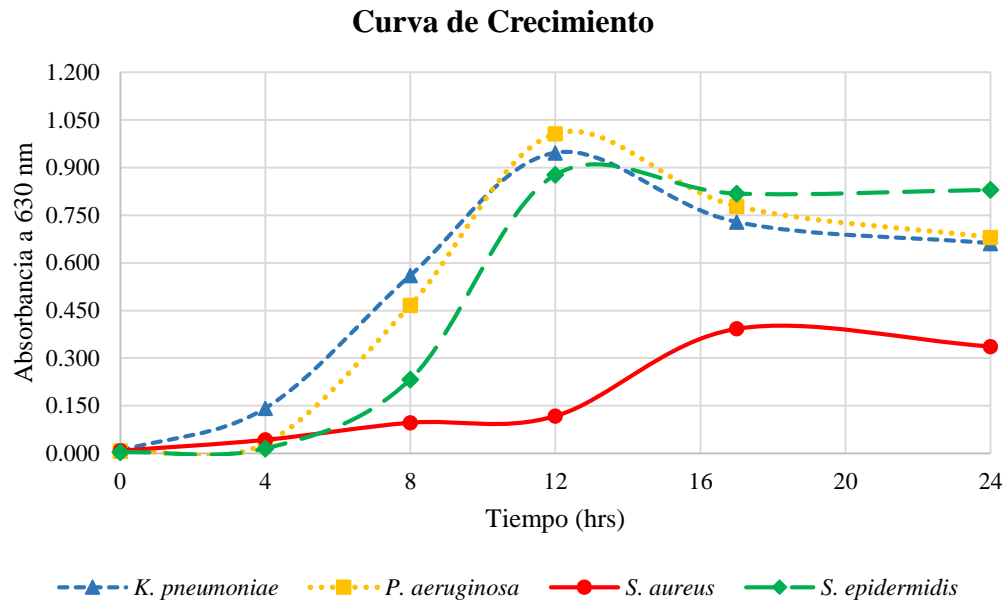


Figura 3: Curva de crecimiento bacteriano de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. La fase lag ocurre entre las primeras 4 horas de incubación, la fase de crecimiento se percibe desde las 4 hasta 12 horas excepto para *S. aureus* que comienza a las 8 horas y se prolonga a 17 horas, la fase estacionaria se mantiene a partir de las 17 horas.

III. Capacidad de Formación de Biopelículas

Se estudió la capacidad de las bacterias aisladas para formar biopelículas y determinar las condiciones experimentales adecuadas a la metodología para el estudio de la formación de biopelículas en presencia de cloruro férrico.

a) Prueba semi-cuantitativa en superficie de vidrio

La formación de biopelículas se determinó por la capacidad de la bacteria para adherirse a la superficie de vidrio, evitar el desprendimiento durante los lavados y teñirse con cristal violeta. Para evaluar la formación de biopelículas se utilizó la siguiente escala (Figura 4).

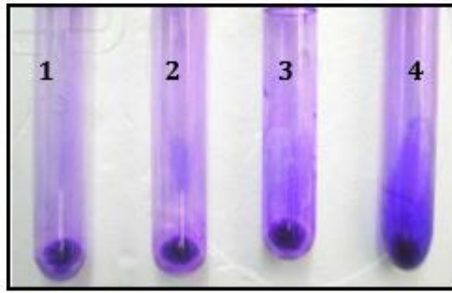


Figura 4: Escala de medición de biopelículas en superficie de vidrio + (1+ baja), ++ (2+ débil), +++ (3+ moderada) y ++++ (4+ fuerte) (Martínez Díaz, 2010).

A continuación se presentan las Figuras 5, 6, 7 y 8 donde se muestran los resultados de la formación de biopelículas de las cuatro cepas sometidas a las temperaturas y tiempos de incubación y densidades ópticas del inóculo de cada cultivo. El porcentaje de formación de biopelícula se basó en la escala de la Figura 4 donde: 1+ equivale al 25%, 2+ al 50%, 3+ al 75% y 4+ al 100%.

La formación de biopelículas se ve favorecida con una temperatura de incubación de 37°C donde se observan que los valores de biopelículas van aumentando conforme aumenta el tiempo de incubación alcanzando el máximo valor a las 48 horas (Figuras 6 y 8). La formación de biopelículas a 25°C (Figuras 5 y 7) también muestran un incremento similar al que ocurre a los 37°C, sin embargo no es tan sutil como ocurre a esta última temperatura ya sus valores aunque son similares no superan los valores de 37°C donde hubo una mejor formación de biopelículas. Con respecto a la densidad óptica de los cultivos se observó que para el caso de *S. aureus* el mayor porcentaje de formación de biopelícula se alcanzó con un inóculo de 0.2 (Figura 6) a pesar de que la presencia de la biopelícula se mantiene estable con el inóculo de 0.3 (Figura 8). En el caso de *S. epidermidis* el mayor porcentaje se alcanzó con un inóculo de 0.3 (Figura 8), aunque también se debe de considerar que con el inóculo

de 0.2 hubo un incremento en la formación de biopelícula hasta de un 50% (Figuras 5 y 6). *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* formaron una mayor cantidad de biopelícula con un inóculo de 0.2 y una temperatura de 37°C (Figura 6), aunque en el caso de la primera bacteria se notó un incremento continuo desde las 12 horas y para el caso de la segunda bacteria su incremento fue a las 24 horas seguido de un descenso.

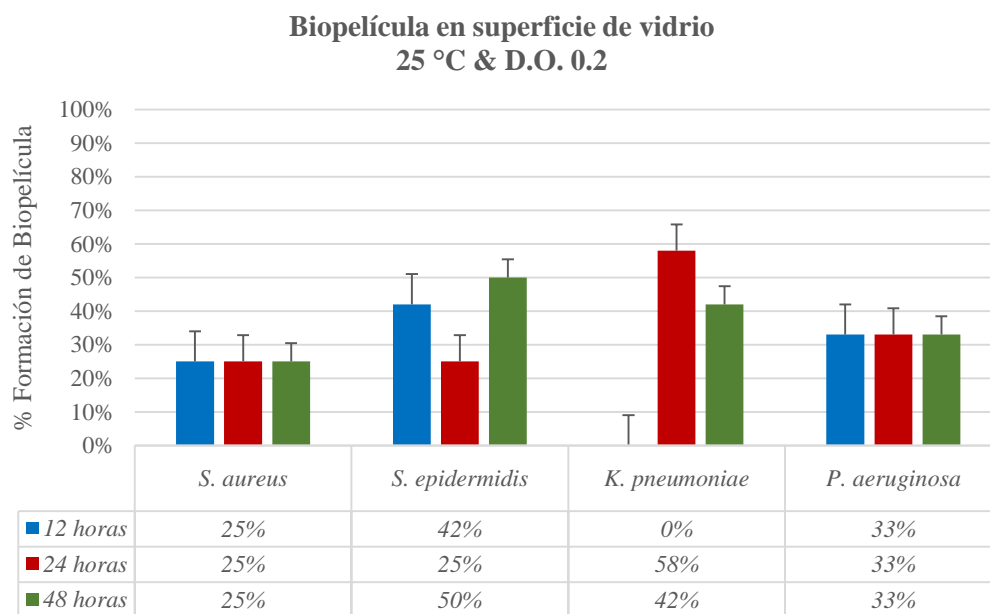


Figura 5: Formación de biopelículas en superficie de vidrio a una temperatura de 25°C y densidad óptica de 0.2, valor $p=0.461$ para tiempo y $p=0.729$ para las cepas, por lo tanto no hay diferencias significativas utilizando esta densidad óptica.

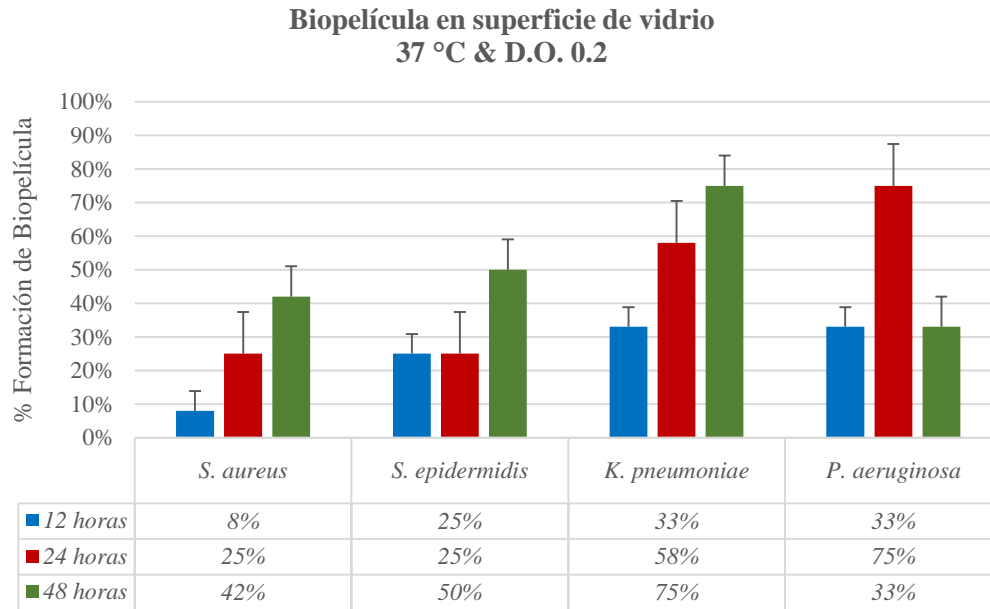


Figura 6: Formación de biopelículas en superficie de vidrio a una temperatura de 37°C y densidad óptica de 0.2, valor de $p=0.028$ para tiempo y $p=0.038$ por lo que existen diferencias por cada bacteria y tiempos de incubación.

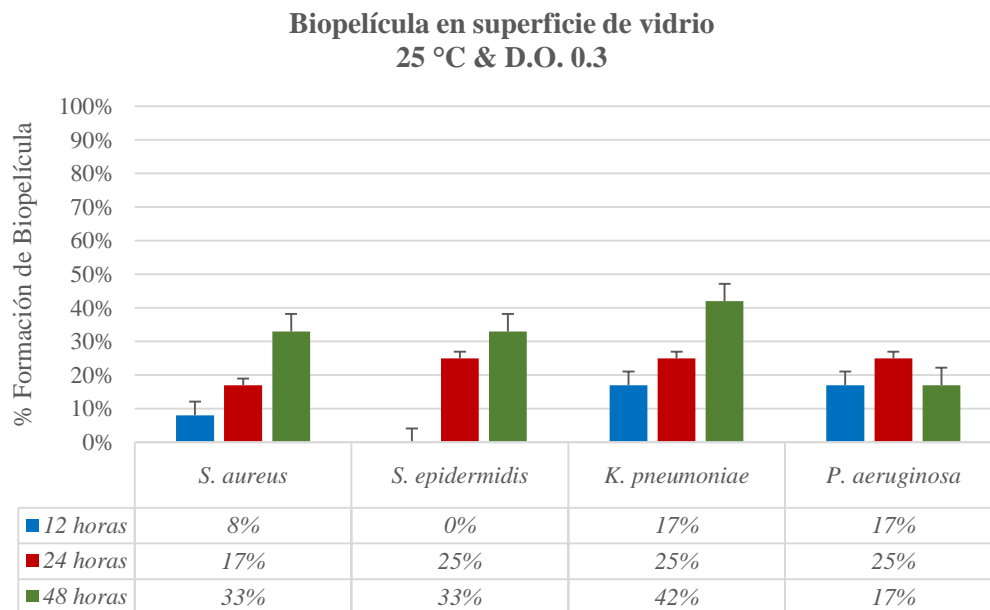


Figura 7: Formación de biopelículas en superficie de vidrio a una temperatura de 25°C y densidad óptica de 0.3, valor $p=0.026$ para tiempo indica que existen diferencias en la formación de biopelícula de acuerdo al tiempo de incubación a esta D.O.; $p=0.692$ para las cepas, no hay diferencias.

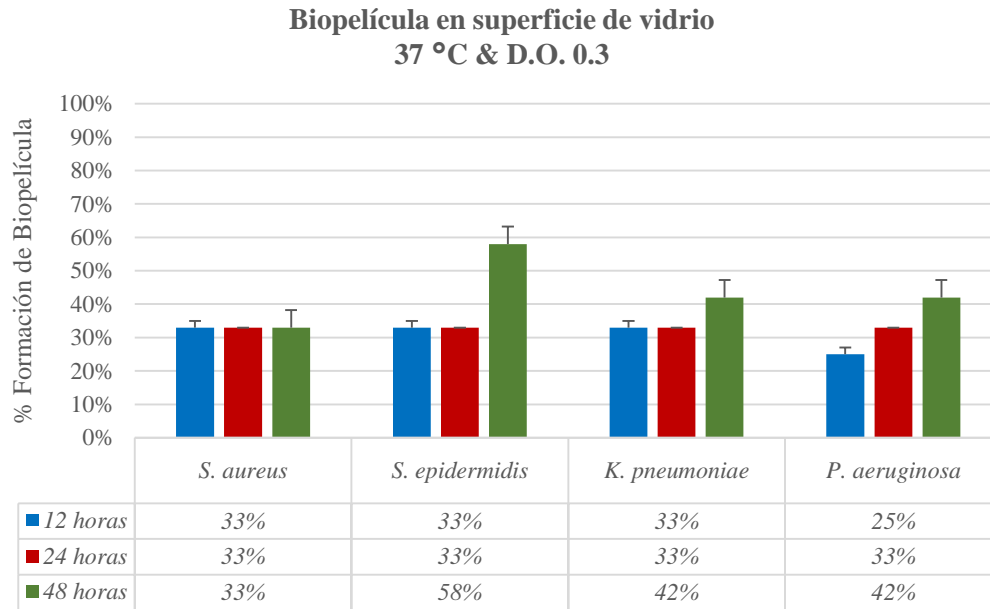


Figura 8: Formación de biopelículas en superficie de vidrio a una temperatura de 37°C y densidad óptica de 0.3, valor $p=0.751$ para las cepas y $p=0.226$ para tiempo por lo que no existen diferencias a esta D.O. con respecto a las bacterias y el tiempo de incubación.

b) Prueba cuantitativa en superficie de polietileno

La prueba en superficie de polietileno, a diferencia de la prueba en superficie de vidrio, no sólo permite visualizar la formación de las biopelículas sino que también a través de la determinación de la absorbancia es posible representar de manera gráfica y expresarlos en datos numéricos comparando las diferentes especies bacterianas.

A la temperatura de 25°C y un inóculo de 0.2 (Figura 9) se puede notar que la formación de biopelículas no es muy favorecida con excepción de *S. epidermidis* ($p<0.05$), el cual produce un incremento en la producción de la biopelícula conforme transcurre el tiempo de incubación, alcanzando su valor máximo a las 24 horas, con una ligera disminución a las 48 horas.

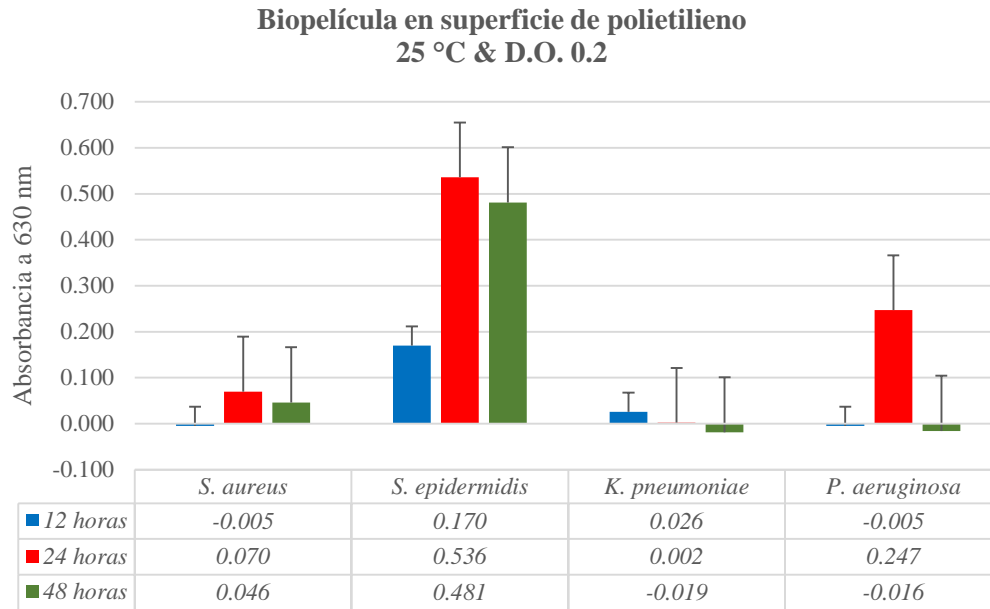


Figura 9: Formación de biopelículas en superficie de polietileno a una densidad óptica de 0.2 y temperatura de incubación de 25°C. Tiempo p=0.259, cepa p=0.006

Las bacterias incubadas a 25°C utilizando un inóculo de 0.3 (Figura 10) muestran resultados contrarios a los que se observaron en la Figura 9 ya que *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* presentaron una mayor formación de biopelícula que *S. epidermidis* y de manera similar al caso anterior es a las 24 horas de incubación donde se alcanza el valor máximo de absorbancia que se correlaciona con la formación de biopelícula, sin embargo en comparación con *S. epidermidis* (D.O. 0.2) la cantidad de biopelícula fue menor. Hay una diferencia significativa en la formación de biopelícula por cada cepa bacteriana y su tiempo de incubación ($p < 0.05$).

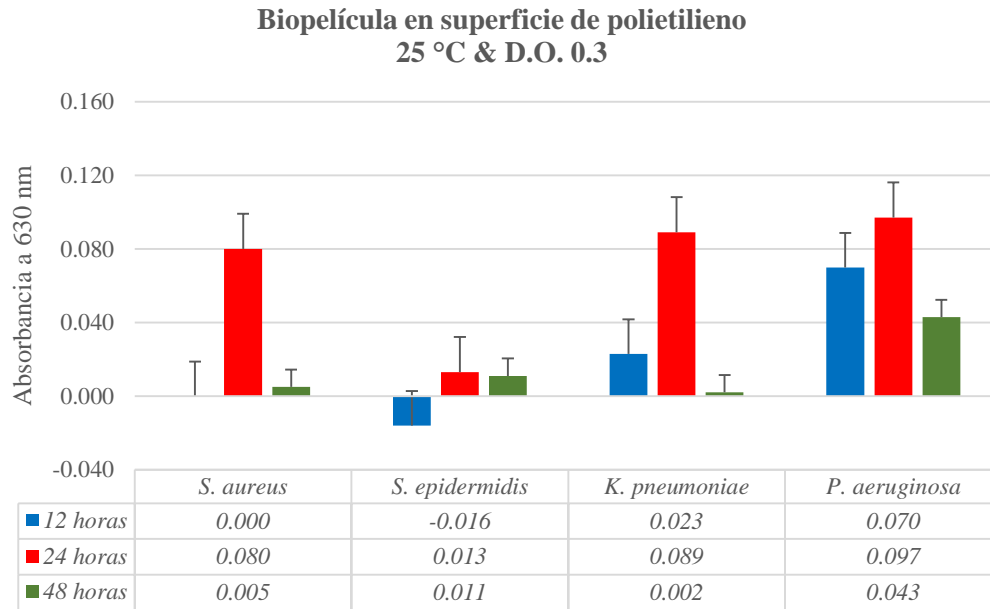


Figura 10: Formación de biopelículas en superficie de polietileno a una densidad óptica de 0.3 y temperatura de incubación de 25°C. Tiempo p=0.001, cepa p=0.003

Bajo las condiciones de temperatura a 37°C y un inóculo de 0.2 (Figura 11) se alcanzan resultados similares a los reportados en la Figura 9, donde *S. epidermidis* nuevamente presenta la mayor formación de biopelícula y se mantiene constante entre las 24 y 48 horas de incubación; la formación de biopelículas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* prácticamente es nula, no obstante *S. aureus* a las 48 horas desarrolló la biopelícula de manera significativa ($p < 0.05$).

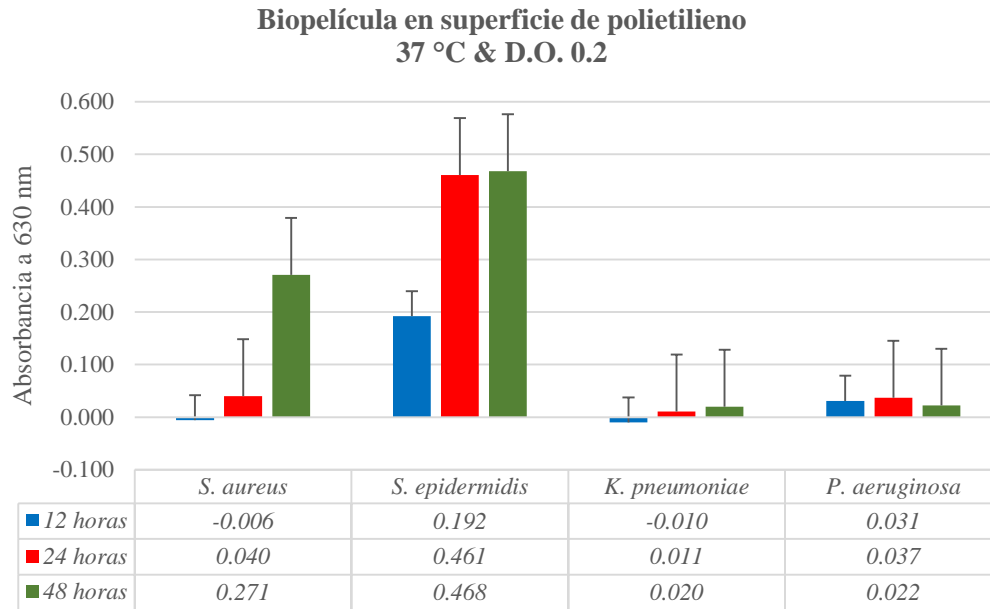


Figura 11: Formación de biopelículas en superficie de polietileno a una densidad óptica de 0.2 y temperatura de incubación de 37°C. Tiempo p=0.313, cepa p=0.007

Se observó que a 37°C y la D.O. 0.3 (Figura 12) que *S. aureus* y *P. aeruginosa* comienzan a formar la biopelícula a las 12 horas de incubación sin embargo con el transcurso del tiempo, tiende a disminuir; ocurre un fenómeno similar con *K. pneumoniae* salvo que a las 48 horas de incubación se presentó un drástico incremento en la formación de la biopelícula. En el caso de *S. epidermidis* la formación de biopelícula fue incrementando de 12 a 24 y abruptamente a las 48 horas, aunque en menor proporción a lo que se observó en la Figura 11. No obstante, la prueba de ANOVA reveló que no existen diferencias significativas aun cuando gráficamente se observa lo contrario ya que $p > 0.05$ para ambos casos, las cepas bacterias y los tiempos de incubación.

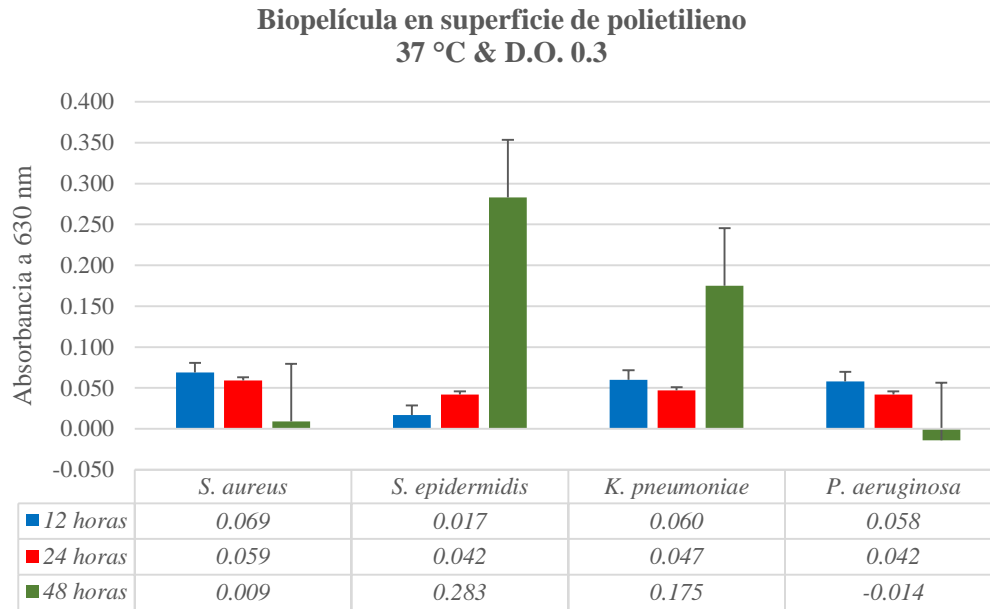


Figura 12: Formación de biopelículas en superficie de polietileno a una densidad óptica de 0.3 y temperatura de incubación de 37°C. Tiempo p=0.208, cepa p=0.248

Con base en los resultados obtenidos, la temperatura óptima para la formación de biopelículas en 3 de las 4 cepas bacterianas es de 37°C con excepción de *P. aeruginosa*, quien desarrolló la biopelícula de manera significativa a 25°C; observándose una mayor formación de biopelícula incubando las cepas bacterianas durante 48 horas. En lo referente a la densidad óptica de los cultivos, la formación de biopelículas para *S. aureus* y *S. epidermidis* corresponde a 0.2, mientras que para *K. pneumoniae* es de 0.3 y para el caso de *P. aeruginosa* se notó que la formación de biopelículas en ambas densidades (0.2 y 0.3) eran similares sin embargo la proporción fue mayor con una temperatura de 25°C.

IV. Identificación de Sideróforos

S. aureus presentó un pico máximo a 432 nm, *S. epidermidis* a 442 nm, *K. pneumoniae* a 423 nm y *P. aeruginosa* a 432 nm. Por lo tanto las 4 cepas bacterianas de este estudio presentan sideróforos del tipo hidroxamato.

V. Disponibilidad de Hierro y Capacidad de Formación de Biopelículas

a) Soluciones de FeCl₃ inoculadas con 1x10⁵ UFC/ml

La producción de biopelícula por parte de *S. aureus* en diferentes concentraciones de hierro se ve favorecida y se muestra un incremento en la biopelícula conforme transcurre el tiempo de incubación y también conforme aumenta la concentración de hierro adicionada lo que puede observarse en los 3 tiempos de incubación, desde la concentración de 100 μ M hasta los 1000 μ M (Figura 13) de manera significativa ($p < 0.05$); las diferencias se acrecientan entre las concentraciones de 100, 200, 400 y 1000 μ M. Además, es importante mencionar que la mayor formación de biopelícula para cada concentración ocurre a las 48 horas de incubación, mostrando que sí existen diferencias en cuanto al tiempo de incubación ($p < 0.05$).

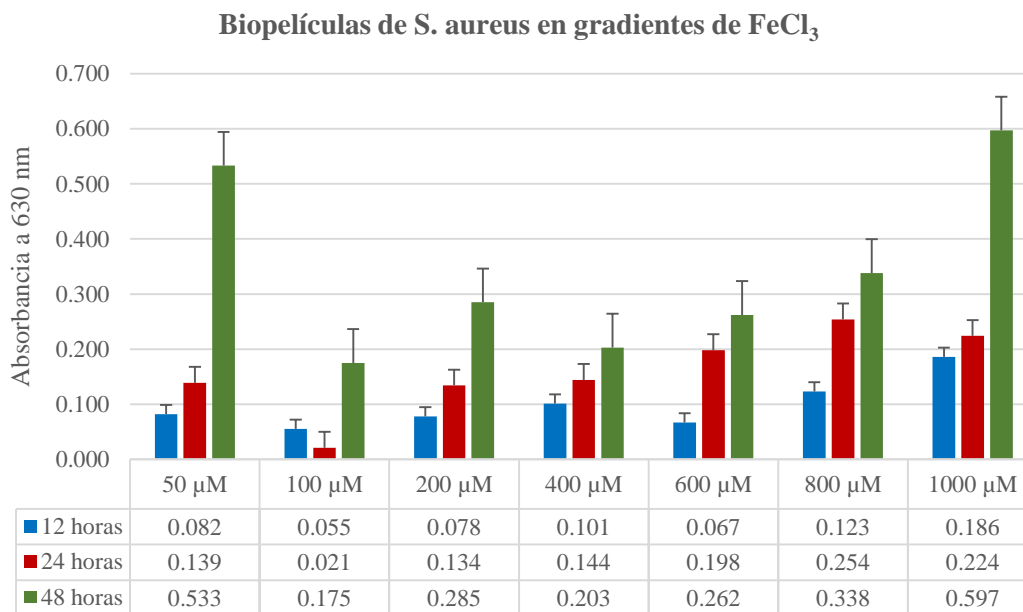


Figura 13: Capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas a diferentes concentraciones de cloruro férrico a 37°C. Concentración $p=0.001$, tiempo $p < 0.05$

De manera similar al comportamiento de *S. aureus* (Figura 13), a las concentraciones de 50 y 1000 μ M *S. epidermidis* alcanza la mayor formación de biopelícula a las 48 horas de

incubación (Figura 14) salvo que en este caso es mayor en la primera; sin embargo al ir aumentando la concentración de cloruro férrico a 100, 200, 600 y 800 μM hay una reducción significativa ($p < 0.05$) en la formación de biopelícula incluso a las 48 horas; al usar la concentración de 400 μM la producción de biopelícula se mantiene constante y es superior a las otras mencionadas pero de nuevo hay una disminución a las 48 horas de incubación. Las diferencias significativas son entre las concentraciones de 50, 100, 400 y 800 μM . A pesar de que se desarrolla mejor la biopelícula a las 48 horas, al analizar los tiempos con la prueba de ANOVA se muestra que los resultados no son significativamente diferentes al someter a *S. epidermidis* a 12, 24 o 48 horas de incubación.

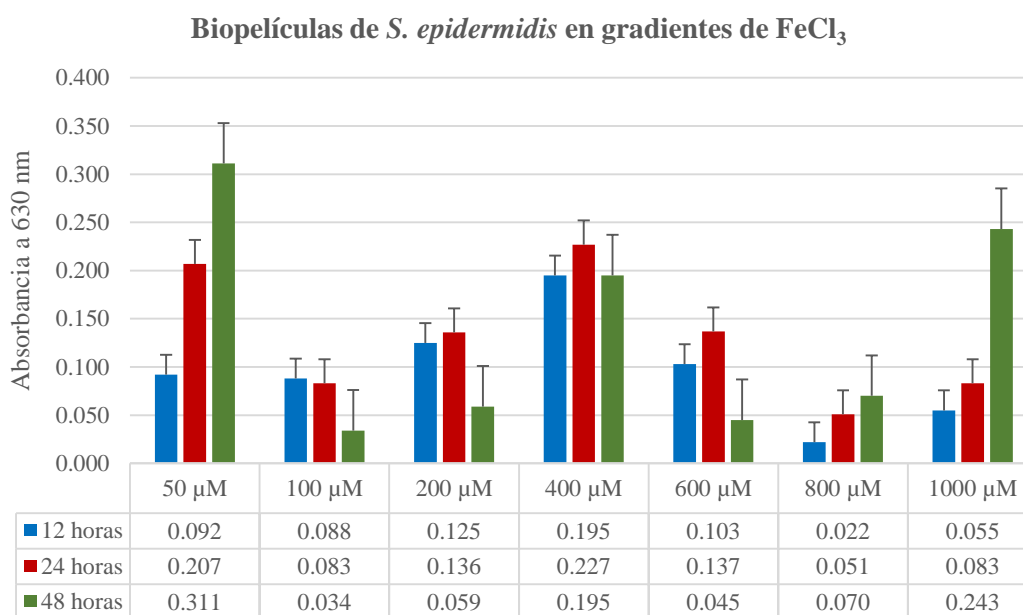


Figura 14: Capacidad de *S. epidermidis* para formar biopelículas a diferentes concentraciones de cloruro férrico a 37°C. Concentración $p=0.001$, tiempo $p=0.295$

K. pneumoniae fue capaz de producir la biopelícula desde las 12 horas de incubación y con el paso del tiempo incrementó su producción (Figura 15), gráficamente no se observaron grandes diferencias en la formación de la biopelícula sometida a las diferentes concentraciones de cloruro férrico sin embargo sí son significativas ($p < 0.05$); nuevamente la

mayor formación se reportó a las 48 horas de incubación, demostrándose el tiempo es un factor importante que influye en la formación de la biopelícula, por otro lado el valor más alto coincidió con la concentración de 1000 μM . Las diferencias ocurren entre las concentraciones de 100, 200 y 1000 μM y entre los 3 tiempos de incubación.

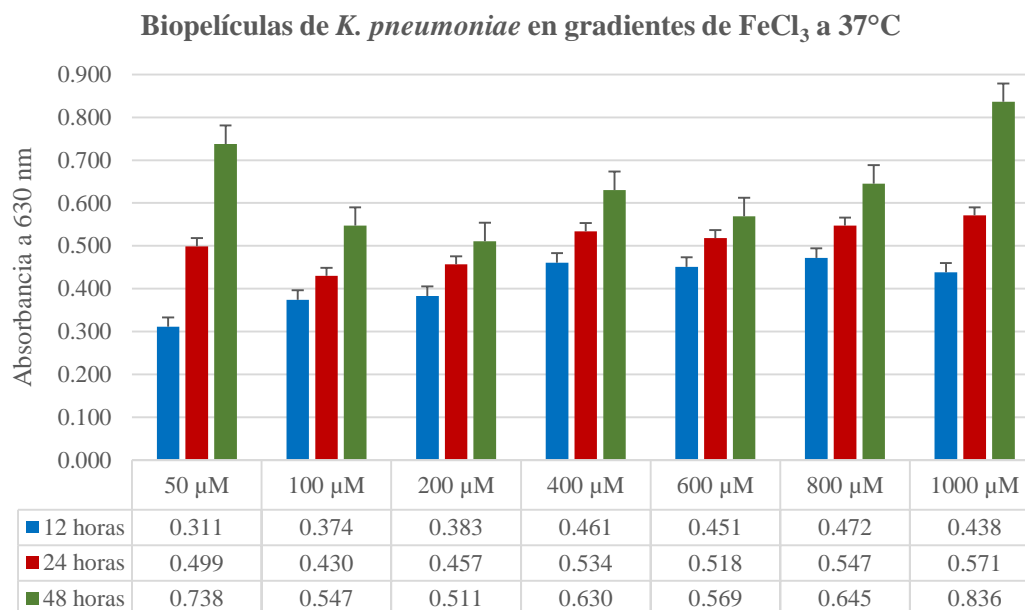


Figura 15: Capacidad de *K. pneumoniae* para formar biopelículas a diferentes concentraciones de cloruro férrico a 37°C . Concentración $p < 0.05$, tiempo $p < 0.05$

El comportamiento de *P. aeruginosa* (Figura 16) fue muy particular ya que evidentemente existen diferencias significativas entre los tiempos de incubación ($p < 0.05$), a 12 y 24 horas no hubo una formación de biopelícula lo que ello ocurre hasta las 48 horas de incubación. No obstante, en este caso es más puntual el efecto que presenta el hierro sobre la biopelícula, conforme aumenta la concentración de cloruro férrico la producción de biopelícula se ve disminuida, también demostrándose diferencias significativas con respecto a las concentraciones de hierro ($p < 0.05$), principalmente entre las concentraciones de 200 y

600 μM contra el resto. Para esta bacteria la concentración a la cual existió una mayor producción de biopelícula fue de 400 μM .

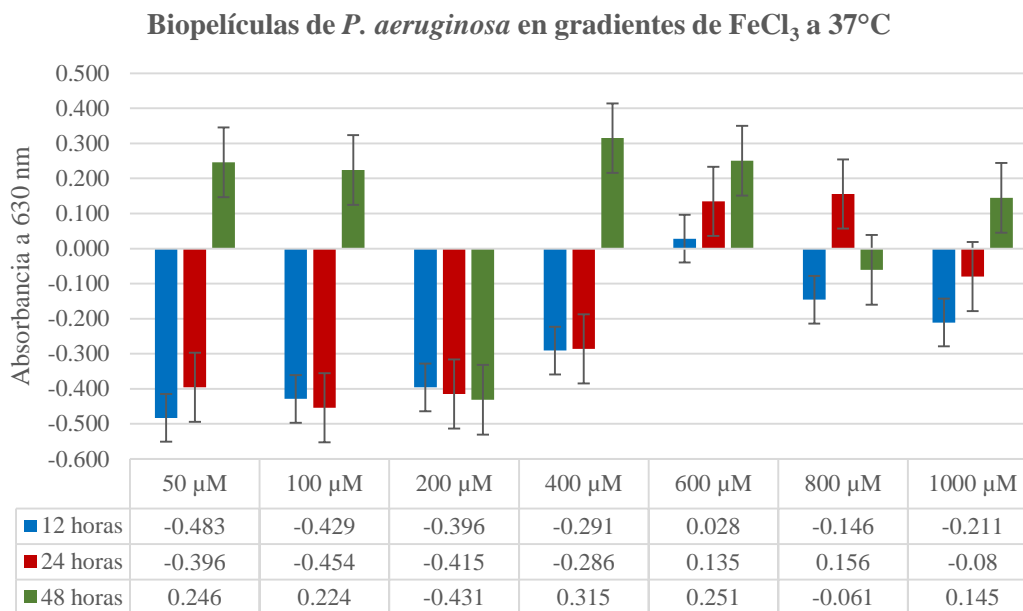


Figura 16: Capacidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas a diferentes concentraciones de cloruro férrico a 37°C. Concentración $p < 0.05$, tiempo $p < 0.05$

b) Cultivos quelados con EDTA y suplementados con FeCl_3

Se determinó la concentración de hierro presente en el medio de cultivo TSA mediante el método colorimétrico de 1,10-Fenantrolina (o-Fenantrolina) obteniendo una concentración de 0.05 mg de hierro por cada 1 g de medio. En base a lo anterior se preparó una solución con un volumen final de 250 ml a la que se adicionaron 0.67 g de EDTA disódico y 0.29 g de cloruro férrico, dicha solución se utilizó para quelar el hierro presente en el medio de cultivo. A partir de esta solución se tomaron los volúmenes correspondientes que se adicionaron a cada medio de cultivo para alcanzar las concentraciones de cloruro férrico deseadas, sabiendo que se necesitan 55.85 mg de hierro para alcanzar la concentración de 1000 μM , empleando la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Tomando como base los resultados de la formación de biopelículas en superficie de polietileno se decidió utilizar las siguientes densidades ópticas para la preparación del inóculo de cada bacteria: para *S. aureus* y *S. epidermidis* se utilizó la densidad óptica de 0.2, *K. pneumoniae* de 0.3 y para *P. aeruginosa* también se tomó como criterio de decisión la formación de biopelícula en la superficie de vidrio y se decidió por 0.2.

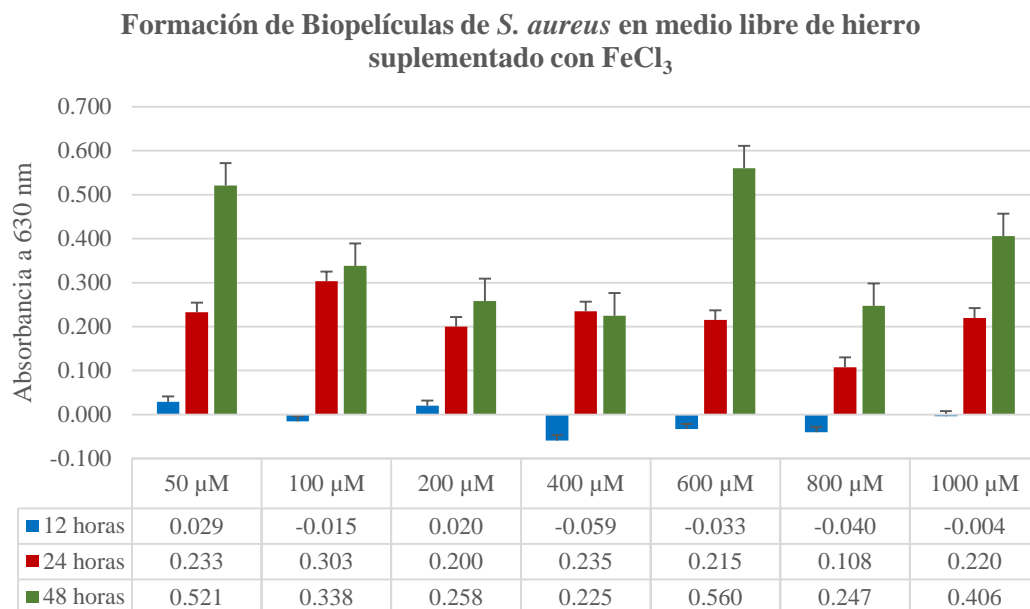


Figura 17: Biopelícula de *S. aureus* a diferentes concentraciones de FeCl₃, D.O. del cultivo 0.2. Concentración $p=0.022$, tiempo $p<0.05$.

Durante las primeras 12 horas de incubación (Figura 17) no hay formación de la biopelícula de *S. aureus* a ninguna concentración, sin embargo a las 24 horas la bacteria comienza a producirla manteniéndose constante, aunque a las 48 horas ya se observa una mayor proporción de biopelícula lo que hace evidente que existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre los 3 tiempos de incubación. Por otro lado también se observa que el desarrollo de la biopelícula disminuye al ir aumentando la concentración de cloruro férrico, aunque

alcanza su valor máximo en la concentración de 600 μM ; se muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones de 50 y 800 μM , aunque ello no ocurre con el resto de las concentraciones.

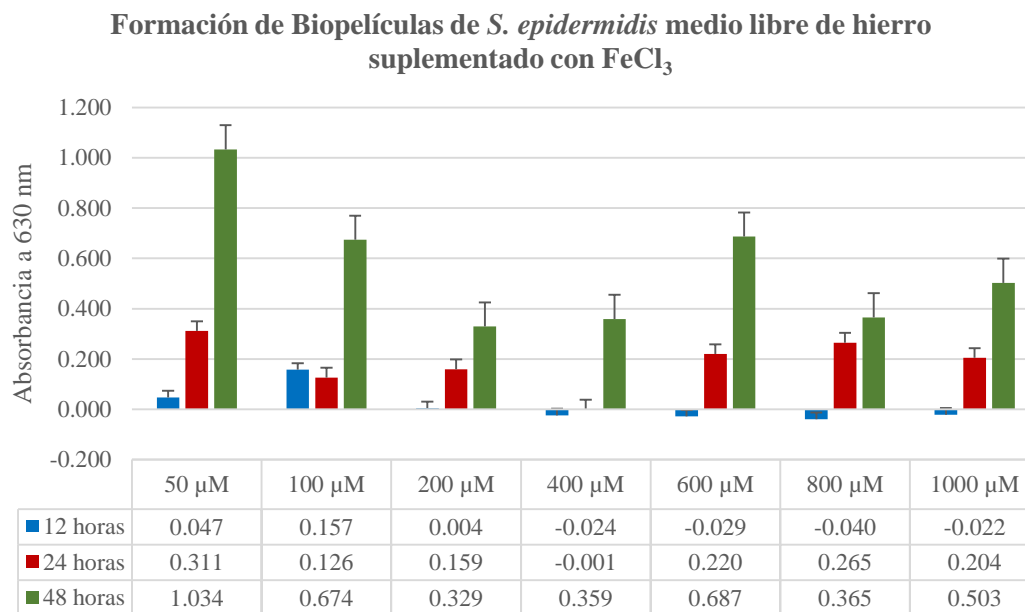


Figura 18: Biopelícula de *S. epidermidis* a diferentes concentraciones de FeCl_3 , D.O. del cultivo 0.2. Concentración $p=0.001$, tiempo $p<0.05$

Se presentó el mismo fenómeno de *S. aureus* en la biopelícula de *S. epidermidis* ya que no hubo formación de ésta a las 12 horas de incubación sino hasta las 24 horas (Figura 18). Es a las 48 horas cuando ocurre la mayor formación de biopelícula ($p < 0.05$); el máximo valor se alcanza a la concentración de 50 μM de cloruro férrico y al aumentar la concentración de hierro disponible se disminuye la formación de la biopelícula, sin embargo las diferencias significativas ocurren entre las concentraciones de 50, 200, 400 y 800 μM .

Formación de Biopelículas de *K. pneumoniae* en medio libre de hierro suplementado con FeCl₃

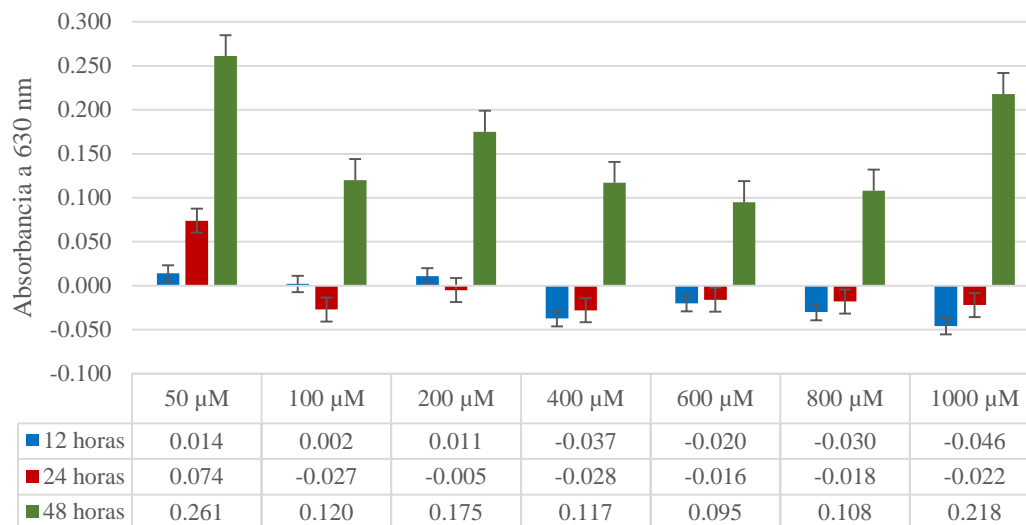


Figura 19: Biopelícula de *K. pneumoniae* a diferentes concentraciones de FeCl₃, D.O. del cultivo 0.3. Concentración $p=0.294$, tiempo $p<0.05$

La formación de biopelícula de *K. pneumoniae* (Figura 19) fue similar al comportamiento que presentaron *S. aureus* y *S. epidermidis*, ya que a las 12 horas de incubación no existió producción de biopelícula, aunque contrario a las otras bacterias tampoco se formó a las 24 horas, si existen diferencias significativas entre 12-24 horas y las 48 horas de incubación ($p<0.05$). Se observó la biopelícula a las 48 horas y nuevamente la mayor proporción se alcanzó con una concentración de 50 µM que fue disminuyendo al aumentar la concentración de cloruro férrico, con excepción de 1000 µM donde nuevamente se incrementa; sin embargo dicha disminución no fue significativa.

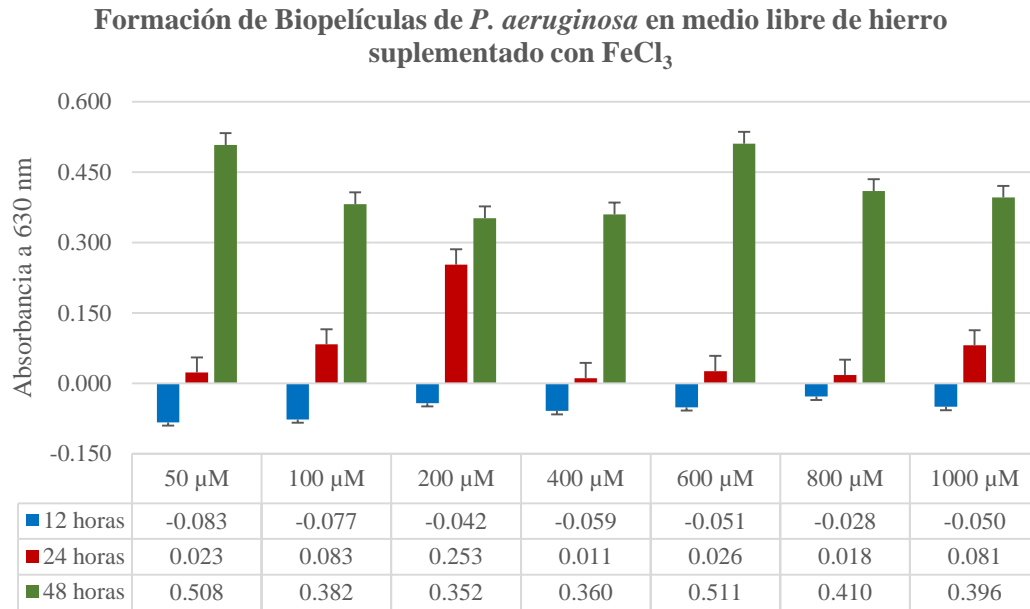


Figura 20: Biopelícula de *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones de FeCl₃, D.O. del cultivo 0.2. Concentración $p=0.927$, tiempo $p<0.05$

El comportamiento de *P. aeruginosa* en la formación de biopelícula (Figura 20) fue similar al resto de las bacterias ya que no hubo una producción de biopelícula a las 12 horas de incubación y a las 24 horas fue mínima su formación, hasta las 48 horas se pudo observar la producción de la biopelícula, mostrando diferencias significativas entre los 3 tiempos ($p<0.05$). La formación de biopelícula de *P. aeruginosa* se mantuvo constante a lo largo de las diferentes concentraciones de cloruro férrico, demostrándose que no existen diferencias significativas entre ellas, alcanzándose la máxima formación a 50 y 600 μM.

c) Inhibición de Biopelículas por Hierro

El efecto de inhibición del hierro en la formación de biopelículas se determinó con base en los resultados obtenidos el capítulo V apartado 5b, comparándolos con el control de cada bacteria al cual no se le adicionó ninguna concentración de hierro. Se manejó la

absorbancia del control como el 100% y se contrastó con los resultados a las 48 horas de incubación, ya que es a este tiempo donde se ve más favorecida la formación de biopelículas.

El efecto del hierro en la formación de la biopelícula de *S. aureus* no fue inhibitorio debido a que resultó favorecer su formación, conforme se aumentó la concentración hay una ligera disminución de la biopelícula sin embargo no se observa una inhibición significativa y la concentración a la cual se forma mejor la biopelícula corresponde a 600 μM de cloruro férrico (Figura 21).

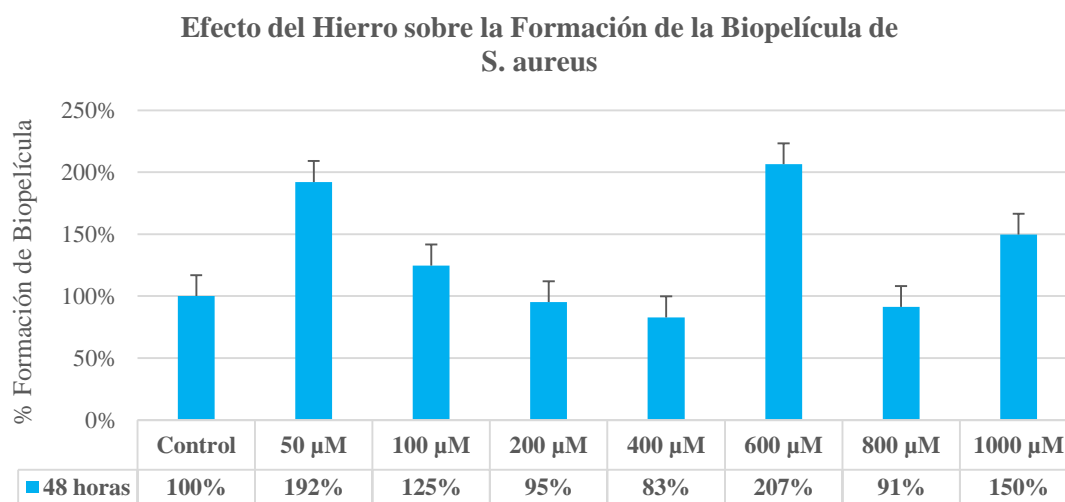


Figura 21: Porcentaje de Formación de Biopelícula de *S. aureus*.

La formación de biopelícula de *S. epidermidis* se ve afectada por la concentración de cloruro férrico a partir de la concentración de 100 μM (Figura 22), ya que al aumentar la cantidad de hierro disponible se presenta una disminución en la formación de la biopelícula, disminuyendo alrededor de un 30% en las concentraciones de 200, 400 y 800 μM . En este caso la concentración adecuada de cloruro férrico corresponde a 50 μM .

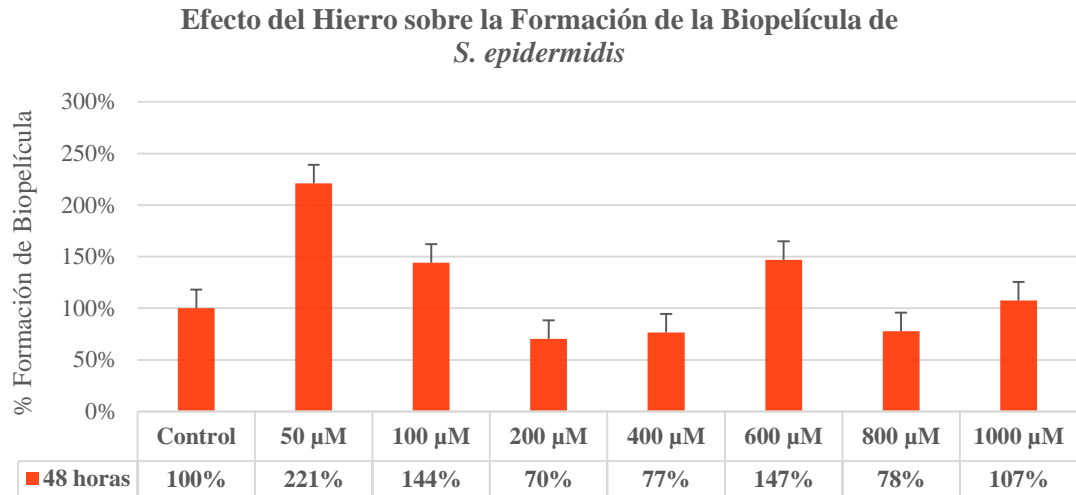


Figura 22: Porcentaje de Formación de Biopelícula de *S. epidermidis*.

El efecto del hierro sobre formación de la biopelícula de *K. pneumoniae* (Figura 23) se percibe más inhibitorio ya que sólo a las concentraciones 50 y 1000 µM de cloruro férrico se favorece el desarrollo de la biopelícula, mientras que en el resto de las concentraciones se observa una disminución de hasta el 50% sobre la biopelícula de *K. pneumoniae*.

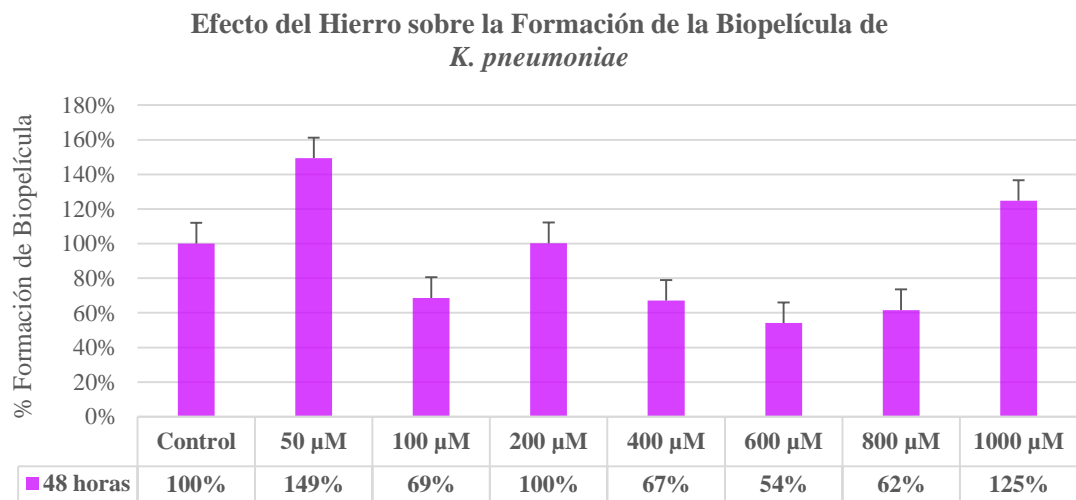


Figura 23: Porcentaje de Formación de Biopelícula de *K. pneumoniae*.

La formación de biopelícula por parte de *P. aeruginosa* no se ve afectada negativamente por el hierro (Figura 24) ya que la presencia de hierro favoreció el desarrollo de la biopelícula, duplicando y casi triplicando sus valores con respecto al control. A pesar de que a todas las concentraciones se alcanzó una buena producción de biopelícula, a 50 y 600 μM se produjo la mayor cantidad de biopelícula, cuyos datos concuerdan con los obtenidos para el resto de las bacterias con excepción de *K. pneumoniae*.

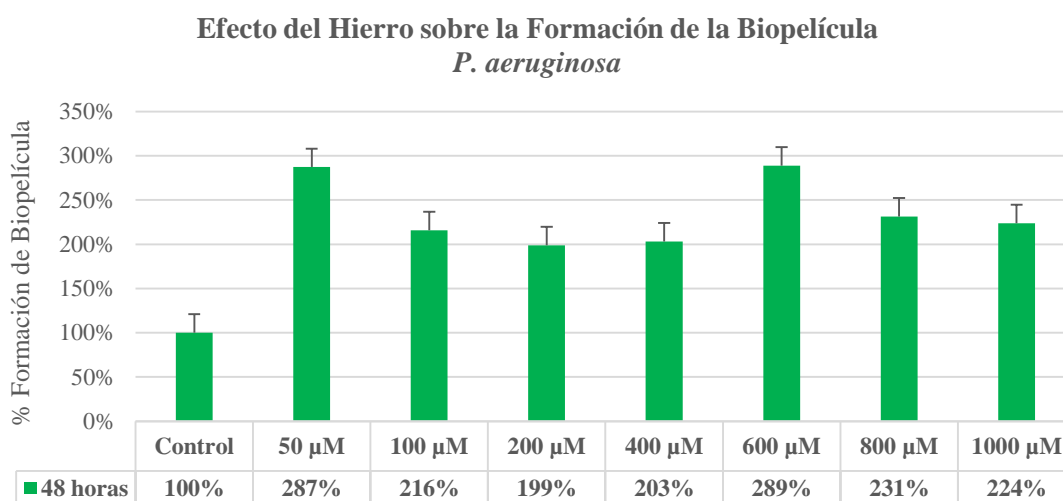


Figura 24: Porcentaje de Formación de Biopelícula de *P. aeruginosa*.