



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Efecto de extractos de brócoli sobre la formación de biopelículas de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii* provenientes de aislados clínicos.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO.

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller Elisabeth Emperatriz Ramírez Polidor como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor (a): Lcda. Victoria Helena Navas Gil.

Caracas, Venezuela.

Mayo, 2019.

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. Elisabeth Emperatriz Ramírez Polidor**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Elisabeth Emperatriz Ramírez Polidor, C.I: 24862124, titulado "Efecto de extractos de brócoli sobre la formación de biopelículas de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii* provenientes de aislados efnícos", para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

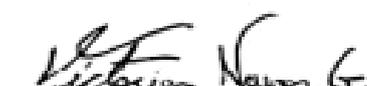
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 24 días del mes de Mayo del año 2019, dejando constar que la Prof. Victoria Navas actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Roxana Gajardo



Prof. María Alexandra García



Prof. Victoria Navas
(Tutor)

DEDICATORIA

A Dios.

Por ser mi guía, que con su infinito amor me ha dado fortaleza para levantarme después de tantos tropiezos; por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio; por permitirme culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis padres, Lisbeth y Francisco.

Que con mucho cariño, me dirijo a ellos como “mi bonita” y “el guigui” porque sin ellos no lo hubiera logrado; por su amor invaluable son mi fuerza, mi apoyo, mi todo. Este éxito es de ustedes.

A mis hermanos Liseth, Franlex y Lexfer.

Que han sido un pilar fundamental para continuar de pie. Los amo.

A mis tíos, Magaly y Leonardo.

Quienes siempre están pendiente de mi, dándome su apoyo incondicional y motivación constante. De verdad tengo mucho que agradecerles, como ustedes no hay.

A mis amigos.

Por hacer de esta trayectoria un intercambio de tristezas y alegrías.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora, Victoria Navas por su ayuda en la dirección de este trabajo de grado.

A la profesora Guillermina Alonso, quien considero un ejemplo a seguir. Gracias por su tiempo y orientación brindada.

A mi jurado, la profe María Alexandra García y la profe Roxana Gajardo por sus detalles y consejos. Gracias profes!

Al Instituto de Biología Experimental, IBE, específicamente al Laboratorio de Biología de Plásmidos bacterianos, por brindarme el espacio y materiales para el desarrollo de este proyecto.

Al Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Centro Médico de Caracas, por las muestras clínicas de estudio.

Al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), IBE.

De igual manera agradezco a las (os) profesores: Beatriz Álvez, Indira Pérez, Maira Oropeza, María Carolina Pérez, Giovanni Angiolillo, Javier Torres y Rafael García por su gran apoyo y aportes para esta investigación.

A mi compañera y amiga de laboratorio, Ariadna Morales y su familia por el apoyo y motivación brindada en los momentos que más necesitaba.

A mis amigos Esthefany Souquett, Frank Zárraga y Antonio Indriago por su apoyo incondicional.

A todos los profesores que de alguna manera u otra contribuyeron a mi formación profesional, para optar al título de Licenciado en Biología.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
1. RESUMEN.....	iv
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. ANTECEDENTES.....	21
3.1. Estudios a nivel internacional.....	21
3.2. Estudios a nivel nacional.....	24
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo general.....	26
4.2. Objetivos específicos.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Material Biológico.....	27
5.1.1. Cepas bacterianas.....	27
5.2. Métodos.....	29
5.2.1. Ensayos de formación de biopelículas.....	29
5.2.2. Efecto del extracto de brócoli sobre <i>A. baumannii</i> 5796 y <i>S. marcescens</i> 4680.....	32
5.2.3. Análisis estadístico.....	36
6. RESULTADOS.....	39
6.1. Determinación de la morfología de colonias de <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Serratia marcescens</i> crecidas sobre agar rojo congo.....	39
6.1.1. Morfología de colonias de <i>A. baumannii</i> crecidas sobre agar rojo congo.....	40
6.1.2. Morfología de colonias de <i>S. marcescens</i> crecidas sobre agar rojo congo.....	42
6.2. Detección de formación de biopelículas de <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Serratia marcescens</i> sobre superficie de vidrio.....	45
6.2.1. Formación de biopelículas de <i>A. baumannii</i> en tubos de ensayo.....	46
6.2.2. Formación de biopelículas de <i>S. marcescens</i> en tubos de ensayo.....	48
6.2.3. Formación de biopelículas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. marcescens</i> sobre varillas de vidrio. 50	
6.3. Efecto del extracto de brócoli sobre <i>Acinetobacter baumannii</i> 5796 y <i>Serratia marcescens</i> 4680.....	51
6.3.1. Efecto del extracto de brócoli sobre el crecimiento bacteriano de <i>A. baumannii</i> 5796 y <i>S. marcescens</i> 4680.....	52
6.3.2. Efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas de <i>A. baumannii</i> 5796 y <i>S. marcescens</i> 4680 en tubos de ensayo.....	56

6.3.3. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre <i>A. baumannii</i> 5796 y <i>S. marcescens</i> 4680.	60
7. DISCUSIÓN	84
8. CONCLUSIONES	91
9. RECOMENDACIONES	93
9.1. Técnicas para evaluar formación de biopelículas bacterianas.	93
9.1.1. Agar Rojo Congo.....	93
9.2. Efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas bacterianas.	94
10. BIBLIOGRAFÍA	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> provenientes de muestras clínicas.....	28
Tabla 2. Cepas de <i>Serratia marcescens</i> provenientes de muestras clínicas.	28
Tabla 3. Características morfológicas de las colonias de las cepas bacterianas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. marcescens</i> , provenientes de muestras clínicas crecidas sobre agar rojo congo.	40
Tabla 4. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de <i>A. baumannii</i> provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 28 °C	47
Tabla 5. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de <i>A. baumannii</i> provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 37 °C.	48
Tabla 6. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de <i>S. marcescens</i> provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 28 °C.	49
Tabla 7. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de <i>S. marcescens</i> provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 37°C.	49
Tabla 8. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre el crecimiento bacteriano de <i>A.baumannii</i> 5796.....	53
Tabla 9. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre el crecimiento bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680.....	55
Tabla 10. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre la formación de biopelículas de <i>A. baumannii</i> 5796 en tubos de ensayo.....	57
Tabla 11. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre la formación de biopelículas de <i>S. marcescens</i> 4680 en tubos de ensayo.....	58
Tabla 12. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el crecimiento bacteriano de <i>A.baumannii</i> 5796.	61
Tabla 13. Resultados estadísticos para el crecimiento bacteriano de <i>A. baumannii</i> 5796.	63
Tabla 14. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el título bacteriano de <i>A. baumannii</i> 5796.	66
Tabla 15. Resultados estadísticos para el título bacteriano de <i>A. baumannii</i> 5796.	68
Tabla 16. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el crecimiento bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680.	71
Tabla 17. Resultados estadísticos para el crecimiento bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680.	73
Tabla 18. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el título bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680.	76
Tabla 19. Resultados estadísticos para el título bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680.	78
Tabla 20. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre la formación de <i>A. baumannii</i> 5796 y <i>S. marcescens</i> 4680.....	81
Tabla 21. Características morfológicas de las colonias de las cepas bacterianas de <i>A. baumannii</i> 5796 y <i>S. marcescens</i> 4680, crecidas sobre agar rojo congo suplementado con extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la formación de una biopelícula.	4
Figura2. Diferencia estructural de biopelículas que crecen en aguas termales hidrotérmicas, ríos de agua dulce y cultivos celulares de laboratorio.	10
Figura3. Microscopía electrónica de barrido de <i>Acinetobacter baumannii</i> (20.000X) (Lee y col., 2006).	13
Figura4. <i>Serratia marcescens</i> por microscopía electrónica de transmisión (20.000X) (De Araújo y col., 2012)	14
Figura5. Estructura química de la colina (Donkin, 2011).	19
Figura6. Morfología de las colonias de las cepas controles de biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MPAO1 y <i>Escherichia coli</i> HB101 sobre ARC incubada por 24 h a 28 °C.	39
Figura7. Morfología de las colonias de la cepa bacteriana <i>A. baumannii</i> 3910 sobre ARC, incubada por 24 h a 28 °C.	41
Figura8. Morfología de las colonias de las 8 cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de muestras clínicas crecidas sobre AN+RC y en AN+RC+AC incubado a 37 °C por 24 h.	42
Figura9. Morfología de las colonias de la cepa bacteriana <i>S. marcescens</i> 4474 sobre ARC, incubada por 24 h a 37 °C.	43
Figura10. Secreción de prodigiosina en colonias de cepas de <i>S. marcescens</i> provenientes de muestras clínicas a 72 h sobre AN, AN+RC y AN+RC+AC.	44
Figura11. Cepas controles de biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MPAO1 y <i>Escherichia coli</i> HB101 sobre superficie de tubos de ensayo incubadas a 37 °C, 48 h.	45
Figura12. Clasificación cualitativa de biopelículas bacterianas formadas en función de la biomasa adherida en tubos de ensayo.	46
Figura13. Formación de biopelículas de cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. marcescens</i> provenientes de muestras clínicas sobre varillas de vidrio incubadas a 28 °C.	51
Figura14. Curvas de crecimiento bacteriano de <i>A.baumannii</i> 5796 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción.	54
Figura15. Curvas de crecimiento bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción.	56
Figura16. Curva de crecimiento bacteriano de <i>A. baumannii</i> 5796 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL.	62
Figura17. Título bacteriano de <i>A. baumannii</i> 5796 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL.	67
Figura18. Curva de crecimiento bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL.	72
Figura19. Título bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL.	77
Figura20. Morfología de las colonias de las cepas de <i>A. baumannii</i> 5796 y <i>S. marcescens</i> 4680 destacando color de las colonias crecidas sobre ARC, 72 h de incubación, 37 °C.	82
Figura21. Morfologías de las colonias de las cepas de <i>A. baumannii</i> 5796 y de <i>S. marcescens</i> 4680 en tres medios: Rojo congo, rojo congo suplementado con colina 2,5 mg/mL y rojo congo suplementado con extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC.** Azul coomassie
- ADN.** Ácido desoxirribonucleico
- ARC.** Agar rojo congo
- CN.** Caldo nutritivo
- CV.** Cristal violeta
- CVCM.** Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.
- DAM.** ADN adenina metiltransferasa
- DE.** Disolvente de Extracción
- DO.** Densidad óptica
- EPS.** Exopolisacáridos
- Ext1.** Extracto de brócoli diluido en metanol
- Ext2.** Extracto de brócoli concentrado
- ME.** Metanol
- MT.** Método tubos de ensayo
- PCT.** Placa de cultivo tisular
- QS.** Detección de quórum
- RC.** Rojo congo
- SS.** Solución salina
- UFC.** Unidades formadoras de colonias

1. RESUMEN

Las biopelículas son responsables hasta del 65% de las infecciones en humanos, tales como caries dental e infecciones de prótesis, por lo que urge la búsqueda de enfoques novedosos para su tratamiento y prevención (de la Fuente-Nuñez y col., 2013). Se han descrito moléculas bioactivas en los alimentos que previenen la formación de biopelículas (Miquel, 2016). Entre estas moléculas bioactivas están los grupos donadores de metilo, siendo la colina una fuente donadora importante de grupos metilos. El brócoli representa uno de los alimentos más ricos en colina, presentando una concentración de 182 mg de colina por 454 g brócoli (Drake, V., 2018). *Objetivo:* Evaluar los efectos de extractos de brócoli en la capacidad de formación de biopelículas de aislados bacterianos clínicos. *Materiales y métodos:* *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens*, dos especies que destacan como patógenos oportunistas nosocomiales, formadores de biopelículas, problemáticos en las instituciones de salud. Para su estudio se utilizó el método de detección de biopelículas con Cristal violeta en tubos de ensayo y Agar Rojo Congo (ARC). Se evaluó el efecto del extracto de brócoli. *Resultados:* Ambas especies forman biopelículas moderadas en agar nutritivo (AN) a 37°C, *A. baumannii* a las 48 h y *S.marcescens* a las 72 h; los ensayos de ARC sugieren que las cepas de *S. marcescens* de estudio secretan fibra curli tipo amiloide. En cambio, las cepas N° 6596, 2317, 7528 y 5796 de *A. baumannii* no secretan fibra curli tipo amiloide. El extracto de brócoli diluido en metanol (Ext1) a 2,5 mg/mL, disminuye la viabilidad celular de ambas especies. En cuanto a los ensayos de formación de biopelículas, se obtuvo que el Ext1 a 2,5 mg/mL, afectó la formación de biopelículas de *S.marcescens* 4680, pasando de ser clasificadas como biopelículas moderadas en su ausencia a débiles en presencia del mismo, a las 72h en caldo nutritivo (CN) a 37°C; sin embargo, no afectó la formación de biopelículas de las cepas de *A. baumannii* 5796, a las 48 h en CN a 37°C. El sustrato colina (Marca Sigma) empleado a 2,5 mg/mL, disminuye significativamente la viabilidad celular y formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y *S.marcescens* 4680, ambas pasando de ser clasificadas como biopelículas moderadas en ausencia del sustrato a no formar en presencia del mismo, afectando también la síntesis de compuestos potenciales de la matriz extracelular según los resultados obtenidos en ARC. *Discusión:* Hay mayor disponibilidad de sustratos donadores de grupos metilos al suplementar el medio con colina, que con respecto a la concentración que hay en el extracto de brócoli utilizado, por lo que la disminución en el crecimiento y formación de biopelículas de las cepas bacterianas de estudio es significativa con colina mas no con el Ext1 a 2,5 mg/mL. *Conclusiones:* El Ext1 a 2,5 mg/mL, disminuye la formación de biopelículas de *S.marcescens* 4680, no así la formación de biopelículas por *A. baumannii* 5796.

Palabras clave: Biopelículas, *A. baumannii*, *S. marcescens*, Agar Rojo Congo, método de tubos de ensayo, extracto de brócoli, colina.

2. INTRODUCCIÓN

I. Biopelículas Bacterianas.

Las biopelículas son estructuras complejas formadas por comunidades de microorganismos que están asociados a una superficie biótica o abiótica, hidrofóbica o hidrofílica, embebidos dentro de una matriz hidratada, con un porcentaje de agua entre 85 y 95 %; seguido de exopolisacáridos (EPS), proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas (Hassan y col., 2011). En conjunto, estas moléculas forman una matriz extracelular, fundamental en la estructura y composición de biopelículas.

La matriz extracelular le confiere a los microorganismos residentes en biopelículas mayor resistencia, tolerancia y persistencia a la exposición de agentes deletéreos del entorno (biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, a la deshidratación, cambios de pH, desinfectantes, antibióticos) facilitando la formación de las biopelículas en distintas condiciones ambientales (Navia y col., 2010).

Las biopelículas son uno de los modos de vida más ampliamente distribuidos y exitosos en la Tierra (Stoodley y col., 2002), aparecen temprano en el registro fósil (hace unos 3.25 billones de años) evidenciándose que la formación de biopelículas es un componente antiguo e integral en procariotas, y un factor clave para la supervivencia en diversos entornos. Las biopelículas representan el formato de vida bacteriano más común. Se ha descrito que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biopelículas y tan sólo 1% vive en estado planctónico, es decir, de vida libre (Nazar, 2007).

A través de las interacciones intercelulares, que difieren entre ambas formas de crecimiento (Abdi-Ali y col., 2014), junto con las propiedades de la matriz extracelular,

el crecimiento de los microorganismos en biopelículas difiere de su condición planctónica. Así, las biopelículas tienen propiedades emergentes que no son predecibles a partir del estudio de células bacterianas de vida libre (Flemming y col., 2016).

Las células residentes dentro de las biopelículas presentan heterogeneidad fenotípica, la cual puede ser desencadenada por las condiciones locales establecidas en biopelículas, que promueven la expresión génica específica y diferencial bacteriana (Singer, 2010).

Por lo tanto, las biopelículas no son ensamblajes pasivos de células que sólo se adhieren a las superficies, sino que representan una entidad biológica funcional, dinámica y compleja que presentan distintos microentornos, haciendo que las bacterias dentro de las biopelículas manifiesten heterogeneidad fenotípica, con una tasa de crecimiento en función de los sustratos y nutrientes presentes en el microentorno que disponen, lo que dificulta su estudio (Hall, 2004).

Es el análisis del proceso de formación de biopelículas es uno de los temas de la microbiología más influyente en el inicio del nuevo milenio. La capacidad de formación de biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos, por lo que se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas (Lasa, 2014).

II. Etapas de formación de biopelículas.

El desarrollo de biopelículas se ha descrito en una secuencia regulada de cinco etapas discretas características: 1. Unión de las bacterias y adhesión reversible a la superficie. 2. Unión irreversible de las células a la superficie. 3. Formación de microcolonias y la secreción de sustancias poliméricas extracelulares. 4. Maduración de

la biopelícula. 5. Dispersión, donde células motiles vuelven a su estado planctónico (Figura 1).

En la etapa uno, la unión bacteriana a una superficie, hay una asociación transitoria y reversible entre células con la superficie, a través de fuerzas físicas como: electrostáticas, estéricas, van der Waals, interacciones hidrofóbicas y adhesinas preformadas (Navia y col., 2010).

En la etapa dos, la colonización bacteriana, se establece la adherencia estable e irreversible entre células y superficie, mediante apéndices específicos. En bacterias se han descrito la síntesis de apéndices importantes para la etapa de adherencia (O'Toole, y col., 2000) Los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y las fibras de tipo curli son estructuras proteicas, producidas en la superficie celular bacteriana, que promueven la agregación celular y, por ende, la formación de biopelículas (Gualdi y col., 2008).

En la etapa tres, la formación de microcolonias y la secreción de sustancias poliméricas extracelulares. Las bacterias adheridas a la superficie se dividen y crecen en fase exponencial, así como producen y secretan sustancias poliméricas, como los EPS, proteínas y ADN, que forman parte de la matriz extracelular (Ramadan, 2006).

En la etapa cuatro, la maduración de la biopelícula, se desarrolla la estructura y arquitectura de la matriz extracelular, estableciéndose espacios intercelulares o canales, así como las células se reorganizan y dividen sus labores, alterando sus procesos fisiológicos, en función de los microentornos establecidos dentro de las biopelículas.

Las propiedades fisiológicas emergentes en biopelículas, ofrece ventajas de sobrevivencia a los microorganismos residentes, de las cuales se destacan: modulación del microambiente, producción de enzimas degradativas y neutralizantes químicos, protección contra agentes antimicrobianos, capacidad de adherencia sobre superficies bióticas y abióticas, eficiencia metabólica, división de labores e intercambio genético

entre las células que conforman la biopelícula (Bridier y col., 2011), ya que el interior de las biopelículas propicia el contacto célula-célula. En conjunto, estas propiedades aumentan la capacidad de sobrevivencia a diversos ambientes, creando un estado ideal para la emergencia de patógenos resistentes a múltiples antimicrobianos (Rodríguez y Pascual, 2008).

En la etapa cinco o dispersión, ocurre el desprendimiento de las células de las biopelículas, ya sea de algunas células aisladas que revierten su estado a bacterias planctónicas o en conglomerados (Lasa, 2014). El desprendimiento de las biopelículas puede ser resultado de fuerzas externas (Post y col., 2004) o por acción de las enzimas producidas por los mismos microorganismos que la componen, los cuales rompen los componentes de la matriz extracelular. Las bacterias desprendidas pueden colonizar nuevos sustratos, reanudando la formación de biopelículas (Navia y col., 2010).

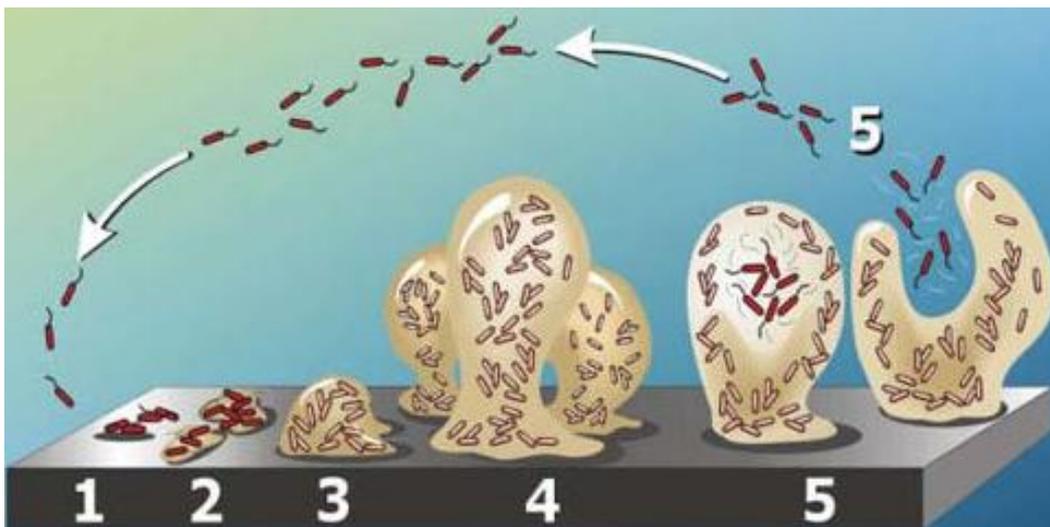


Figura 1. Etapas de la formación de una biopelícula.

1. Unión de las bacterias y adhesión reversible a la superficie. 2. Unión irreversible de las células a la superficie. 3. Formación de microcolonias y la secreción de sustancias poliméricas extracelulares. 4. Maduración de la biopelícula. 5. Dispersión, células motiles vuelven a su estado planctónico (Tomado y modificado de Ramos, 2014).

Las bases fenotípicas de las biopelículas se atribuyen a la capacidad bacteriana de adherirse a superficies y la síntesis de la matriz extracelular, siendo esta respuesta adaptativa estimulada por las condiciones del entorno.

III. Adhesión bacteriana a superficies.

La capacidad de las bacterias de adherirse sobre superficies presentes en diversos entornos, está indudablemente relacionada con la ventaja selectiva que ofrece la asociación superficial. Las superficies proporcionan el espacio y estabilidad de crecimiento (Hall, 2004).

Las propiedades físico-químicas de la superficie ejercen una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión. La adhesión de bacterias incrementa en aquellas superficies ásperas, en las cuales las fuerzas de deslizamiento están reducidas y el área de superficie es mayor (Thomas, 2006). Se ha encontrado también que los microorganismos tienden a adherirse sobre superficies hidrofóbicas, no polarizadas, como el teflón y otros plásticos; en comparación con materiales hidrofílicos, como vidrio o metales.

Las superficies condicionadas son aquellas que están en contacto (embebidas o sumergidas) con un líquido, cuyos componentes se adsorben a la superficie. El proceso de adsorción modifica las propiedades de la superficie lo que puede llegar a cambiar la adhesión bacteriana (que se forma antes de la colonización de los microorganismos), promoviendo la adhesión selectiva de las bacterias a la superficie, pudiendo ser, además, una fuente de nutrientes. Las bacterias planctónicas potencialmente pueden transportarse sobre una superficie condicionada, sin embargo, son las propiedades fisicoquímicas de las superficies las que determinan la adherencia microbiana (Navia y col., 2010).

Por otra parte, la síntesis de la matriz extracelular incurre en un costo energético celular que se justifica evolutivamente, debido a la centralidad estructural y físico-química de la matriz para la formación y función de las biopelículas, sin la cual no surgirían las propiedades beneficiosas estructurales y funcionales de las biopelículas, tal como la hidratación, la captura de recursos, la capacidad digestiva y la protección contra los antimicrobianos (Flemming y col., 2016).

IV. Matriz extracelular de las biopelículas bacterianas.

La matriz extracelular es una red hidratada de polímeros, secretados por las bacterias que componen las biopelículas bacterianas y de acuerdo a su composición y estructura, determina la arquitectura y fisiología de las biopelículas (Hall, 2004).

– Matriz extracelular de acuerdo a su composición.

La matriz extracelular está compuesta principalmente de polisacáridos extracelulares (EPS), seguidos de otras macromoléculas en menor cantidad como proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y otras sustancias poliméricas hidratadas procedentes de lisis de las bacterias (Sutherland, 2001; Branda, y cols., 2005). El agua representa el componente mayoritario de la matriz extracelular, con un porcentaje entre 85 y 95 % del contenido total de biomasa en biopelículas (Lasa, 2014).

Los EPS están localizados en la superficie externa de las células microbianas, encontrándose diversidad en composición química y propiedades físicas (Wingender y col., 1999). Estos polisacáridos son moléculas complejas formadas por unidades simples repetitivas de carbohidratos, unidas mediante enlaces glicosídicos, dando lugar a estructuras lineales o ramificadas, que pueden estar constituidas por miles de unidades de monosacáridos (Roberts, 1996).

En la estructura química de los EPS, se pueden encontrar distintos sustituyentes orgánicos e inorgánicos que producen una complejidad estructural adicional. Se han descrito EPS de carácter ácido, debido a la presencia de ácidos urónicos, grupos fosfato y piruvato (Roberts, 1996).

Otros EPS forman una capa amorfa que rodea la célula bacteriana, estos se organizan en una estructura distinta denominada cápsula. Las cápsulas de polisacáridos presentan interacciones no covalentes con fosfolípidos o moléculas de lípidos A de la membrana celular. Los EPS que forman cápsulas pueden mediar interacciones bacteria-superficie, resultando un factor importante en la virulencia de muchos patógenos animales y vegetales (Roberts, 1996).

La síntesis y secreción de EPS en las células bacterianas se reconoce por la formación de colonias mucosas en el crecimiento del microorganismo en medio sólido, el aumento de viscosidad e, incluso, la formación de un gel en medios líquidos (Sutherland, 1988).

Para la detección y visualización de los EPS en laboratorio se utilizan diversas técnicas. En algunos casos se utilizan tinciones. La técnica de Rojo Congo es uno de los métodos utilizados para la detección de sustancias poliméricas extracelulares en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, a través de la evaluación de las morfologías de colonias crecidas en placa suplementadas con el colorante Rojo Congo (RC) (Gualdi y col., 2008), considerado como un método cualitativo de fácil uso para la detección de capacidad de desarrollo de biopelículas bacterianas (Hassan y col., 2011).

El RC se emplea para detectar secreción de fibras proteicas y EPS, mediante la manifestación de morfotipos (Hassan y col., 2011). El RC es un compuesto orgánico cargado negativamente (aniones), el cual se combina con los constituyentes celulares cargados positivamente (cationes). Esta sal sódica suplementada en agar nutritivo, se

une a los componentes secretados por aquellos microorganismos potencialmente capaces de formar biopelículas (Martínez y col., 2008).

En *S. typhimurium* y *E. coli* se ha estandarizado que la presencia/ausencia de los componentes principales de biopelículas (fibras de tipo curli y celulosa) afectan las morfologías de colonias en RC: las colonias rosadas-rojas son cepas productoras de fibras curli tipo amiloide; mientras que las colonias blancas, no lo son (Gualdi y col., 2008).

La técnica de Agar Rojo Congo se suplementa además el colorante azul coomassie (AC), que aumenta el contraste de color de las colonias (Zhou y col., 2013). El AC se emplea usualmente en técnicas para estimar concentración de proteínas (Salinas, 2001).

La composición y estructura de la matriz extracelular en biopelículas varía en función de los estímulos y condiciones del entorno; además de la fisiología de los microorganismos (Hall, 2004). Se ha descrito como componentes principales de la matriz extracelular el alginato en *P. aeruginosa*, la celulosa en *Salmonella typhimurium*, la galactosa en *Vibrio cholerae* y poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria incluso puede producir distintos EPS, dependiendo de las condiciones ambientales (Kaplan y col., 2004).

– **Matriz extracelular con respecto a su estructura.**

La matriz extracelular confiere una organización espacial a las biopelículas, de las cuales derivan gradientes pronunciados, alta biodiversidad e interacciones complejas, dinámicas y sinérgicas, incluida la comunicación célula-célula y la transferencia horizontal de genes (Flemming y col., 2016).

Se ha demostrado mediante observaciones *in situ* por microscopía láser confocal, que la estructura en biopelículas de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *V. cholerae* consisten en el desarrollo secuencial de microcolonias heterogéneas, rodeadas de matriz extracelular e intercaladas con una estructura de canales de agua (Hall, 2004), los cuales permiten el flujo de agua, la absorción e intercambio eficiente de nutrientes y oxígeno, en zonas profundas de las biopelículas. Sin embargo, la existencia de estos canales no evita que se establezcan los diferentes microentornos dentro de las biopelículas, en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno varía (Stoodley, y cols., 2002; Lasa, 2014).

Las estructuras heterogéneas de las biopelículas están influenciadas por las condiciones del entorno. Por ejemplo, dependiendo de la fuente de nutrientes, las biopelículas pueden ser planas o en forma de hongo (Hall, 2004).

En la Figura 2, se muestra la diferencia entre la estructura de biopelículas que crecen en ambientes quiescentes y las que se forman en flujos más rápidos, las primeras tienden a formar estructuras circulares o montículos (Fig.2. a, d, g); en cambio las segundas, forman biopelículas serpentinas (Fig.2. b, e, h, i) y/o con estructuras de ondulación (Fig.2. c, f).

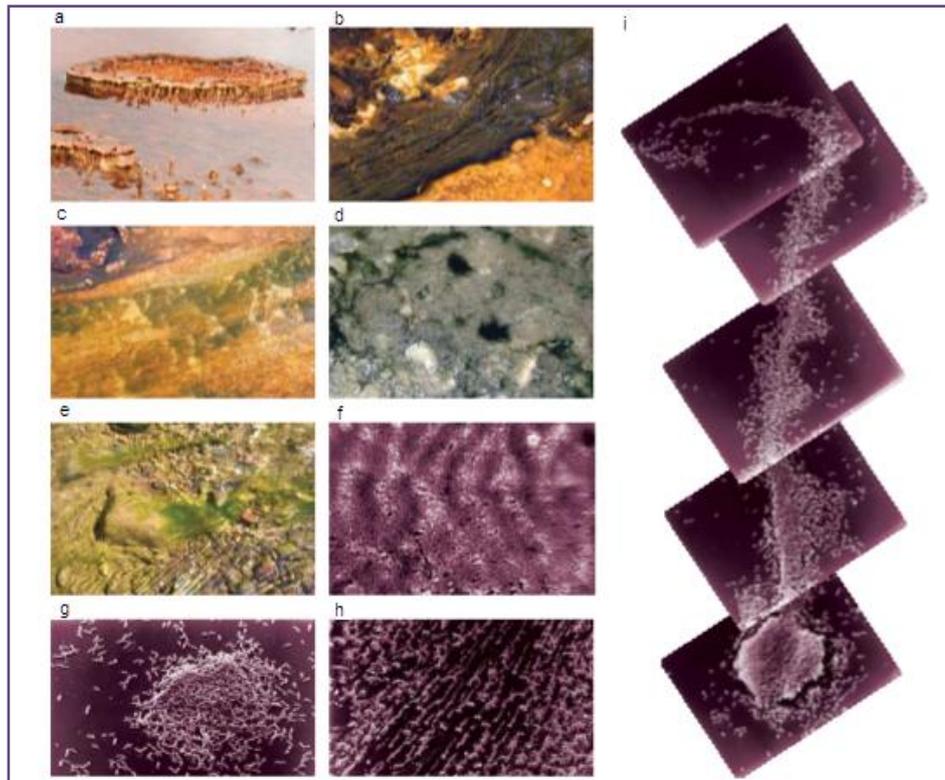


Figura 2. Diferencia estructural de biopelículas que crecen en aguas termales hidrotérmicas, ríos de agua dulce y cultivos celulares de laboratorio.

Se observan estructuras similares en biopelículas que crecen en aguas termales (a-c), biopelículas que crecen en ríos de agua dulce (d, e) y cultivos celulares de laboratorio (f-h). Las biopelículas provienen del área termal de Biscuit Basin, Parque Nacional Yellowstone, EE. UU. (a-c), Gardener River, Parque Nacional Yellowstone, EE. UU. (d), Hyalite Creek, Bozeman, Montana, EE. UU. (e), biopelículas de especies mixtas cultivado a velocidad de flujo de 1 ms^{-1} y una biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* desarrollada en una celda de flujo con un flujo de 0.03 ms^{-1} (g) o 1 ms^{-1} (h, i). (Tomado y modificado de Hall, 2004).

No solo existen contribuciones relativas de las condiciones del entorno al desarrollo de la estructura de las biopelículas, sino también contribuciones genéticas. Estos no son mutuamente excluyentes, los mecanismos genéticos asociados a un conjunto específico de condiciones de crecimiento, requieren más experimentos multifactoriales para determinar cómo interactúan las respuestas genéticas y ambientales (Hall, 2004).

Las biopelículas son sistemas complejos heterogéneos que típicamente comprenden muchas especies, que pueden formarse sobre cualquier superficie viva o inerte. Se han descrito el desarrollo de biopelículas en aguas termales, ríos de agua

dulce, cascos de los barcos, superficie interna de tuberías, macetas en las que se han depositado flores, cortina de baño. Las biopelículas también están asociadas sobre superficies bióticas, incluyendo a los organismos superiores: los humanos están colonizados por microorganismos que forman biopelículas, que pueden estar vinculados con infecciones persistentes (De Vos, 2015).

V. Infecciones bacterianas asociadas a biopelículas.

Una infección se define como la colonización, invasión y multiplicación de microorganismos bacterianos sobre una superficie del cuerpo humano (Ma y Shortliffe, 2004).

En la actualidad se reconoce que la formación de las biopelículas es un aspecto importante en la mayoría de las enfermedades bacterianas, tales como endocarditis de válvula nativa, caries dental, infecciones de prótesis, infecciones de implantes oculares, e infecciones crónicas del pulmón en los pacientes con fibrosis quística, entre otros (Donlan y Costerton, 2002). Estas infecciones se establecen bajo determinadas características como la existencia de un tejido dañado, pequeños inóculos bacterianos inicialmente que invaden un tejido estéril de bacterias, o bacterias que evaden al sistema inmunitario y a los antibióticos (Stoodley, y cols., 2002).

El proceder de las biopelículas tiene profundas consecuencias en la supervivencia de procariotas en el entorno médico. En general, se ha demostrado que los dispositivos médicos implantables pueden portar biopelículas, provocando infecciones asociadas (Hall, 2004).

Se identificó que las infecciones relacionadas con los dispositivos médicos (infecciones clínicas) que tienen una etiología de biopelículas, muestran que su formación puede estar facilitada por la respuesta inflamatoria del huésped. Las

moléculas inflamatorias del hospedador facilitan la adhesión a la superficie del dispositivo y, además, las biopelículas ya formadas son más resistentes a las mismas respuestas mediadas por el huésped (como a proteínas del complemento y fagocitos) (Hall, 2004).

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas es la tolerancia a los tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biopelículas normalmente no consiguen ser completamente erradicadas, y producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias planctónicas, crecidas en medio líquido (Costerton, 1999; Mah y O'Toole, 2001).

Las biopelículas son responsables de un grupo significativo de enfermedades humanas, por lo que urge la búsqueda de enfoques novedosos para su tratamiento y prevención. Para ello, es necesario implementar nuevos métodos de detección de biopelículas y desarrollar nuevas estrategias de control y tratamiento, que ayuden a prevenir el desarrollo de biopelículas y a combatir las biopelículas ya formadas (Nazar, 2007).

En particular hay dos especies formadoras de biopelículas, que han surgido como patógenos oportunistas problemáticos en las instituciones de salud, *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens*.

- Patógenos nosocomiales: *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens*

La especie *Acinetobacter baumannii* es una de las 17 especies del género *Acinetobacter* y se identifica a nivel microbiológico como un cocobacilo, Gram

negativo (Figura 3), estrictamente aeróbico, oxidasa negativo, no fermentador e inmóvil (Peleg y col., 2008; Espinal y col., 2011).

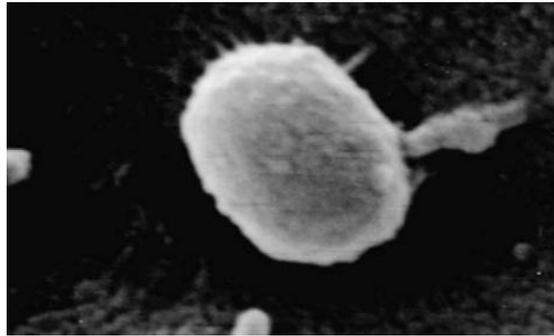


Figura3. Microscopía electrónica de barrido de *Acinetobacter baumannii* (20.000X) (Lee y col., 2006).

La especie *A. baumannii* ha surgido como uno de los patógenos más problemáticos globalmente para las instituciones de salud. Su importancia clínica, especialmente en los últimos 15 años, ha sido impulsado por su notable capacidad en adquirir determinantes de resistencia, por lo que es uno de los organismos que amenazan la era actual de antibióticos (Lee y col., 2006).

La especie *A. baumannii* tiene la habilidad de evitar la desecación por más de treinta días en superficies secas, aunque esto depende del origen de la cepa. De igual manera, muchas cepas son capaces de formar biopelículas sobre superficies de vidrio o plástico, vía formación de pili y EPS, lo que les permite sobrevivir en distintas superficies bióticas o abióticas como sábanas y mobiliario, catéteres y tubos respiratorios (Abdi-Ali y col, 2014).

Entre las infecciones causadas por *A. baumannii*, se encuentran periodontitis, neumonía, infecciones del tracto urinario, septicemia, bacteremia y meningitis. Sin embargo, este patógeno también puede causar infecciones prolongadas de manera asintomática, por lo que el control de los brotes infecciosos causados por *A. baumannii*,

requiere la erradicación total de esta bacteria del ambiente hospitalario (Pour y col., 2011).

Por otra parte, la especie *S. marcescens* (Figura 4) se identifica a nivel microbiológico como un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo y motil que causa infecciones en humanos, animales e insectos (Mahlen, 2011).

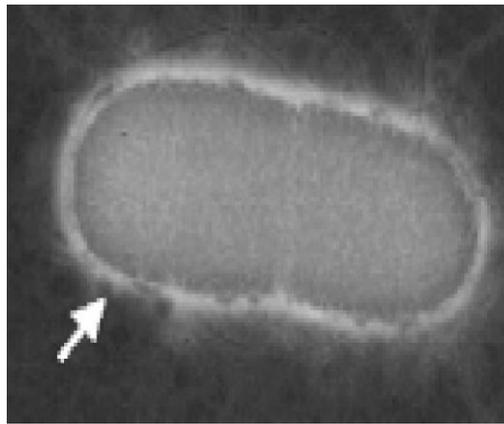


Figura4. *Serratia marcescens* por microscopía electrónica de transmisión (20.000X) (De Araújo y col., 2012)

La especie *Serratia marcescens* es un patógeno oportunista importante, particularmente para pacientes inmunocomprometidos. Es factor etiológico poco frecuente de infecciones adquiridas en la comunidad, pero ha emergido como un importante patógeno causante de infecciones hospitalarias (Rice, 2005).

En los últimos 60 años, la especie *S. marcescens* se ha convertido en un agente de gran relevancia clínica, responsable de brotes nosocomiales, provocando infecciones, como neumonía, de las vías urinarias, de heridas quirúrgicas, meningitis, endocarditis y sepsis (Carrillo, 2015).

Una de las características de este bacilo es la producción de un pigmento no difusible llamado prodigiosina, que forma parte de una familia de pigmentos rojos naturales, que se distinguen por un esqueleto común de pirrolilpirrometano. Los

biotipos de *S. marcescens* pigmentados se encuentran en ambientes naturales; en el ámbito hospitalario, en cambio, algunos biotipos no generan pigmentos. La principal diferencia entre las cepas pigmentadas de las no pigmentadas es el bloqueo de la síntesis de 2-metil-3-amilpirrol o 4-metoxi-2,2bipirrol-5-carboxaldehído, que son componentes esenciales en la ruta biosintética de prodigiosina. Las cepas no pigmentadas de *S. marcescens* son generalmente más resistentes a los antibióticos que las cepas pigmentadas, porque a menudo albergan plásmidos de resistencia (Carrillo, 2015).

Las biopelículas son cada vez más reconocidas como la forma predominante de crecimiento en bacterias. Esta entidad funcional presenta una elevada resistencia en contra de las tensiones medio ambientales, como estrés oxidativo, nutricional y las respuestas mediadas por el huésped. Probablemente, es la complejidad del desarrollo de las biopelículas que le confiere dicho fenotipo de resistencia. Por esto las biopelículas presentan el próximo desafío en microbiología: enfrentar esta complejidad y diseñar protocolos de prueba más relevantes para tratar los exigentes problemas microbianos en la medicina (Hall, 2004).

Por lo tanto, es cada vez más importante comprender cómo se forman y se desprenden las biopelículas, incluidos los factores internos y externos que controlan estos procesos. Dentro de los factores internos se encuentran los mecanismos moleculares, en ellos es importante conocer la regulación de la expresión de genes específicos o asociados a la formación de biopelículas.

VI. Regulación de la expresión génica de formación de biopelículas.

La capacidad de los procariotas para adoptar diferentes estructuras de biopelículas en respuesta a las condiciones del entorno, se debe a la regulación de expresión genética, que le confiere la capacidad de adaptarse a las condiciones fluctuantes e impredecibles del entorno (Hall, 2004).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación de biopelículas está modulado por una compleja cascada de reguladores. Entre ellas, se demostró que la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* está regulada por un proceso de quorum sensing o detección del quórum (QS) (Lasa, 2014). Se conoce que el quórum es un atributo común de muchas especies bacterianas y que puede ser un carácter universal de las bacterias. Actualmente se siguen describiendo nuevas señales y nuevos sistemas de regulación por quórum (Fuqua y Greenberg, 2002).

El sistema de QS es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación de una molécula señal en el medio ambiente denominado autoinductor, que permite percibir la densidad de población existente. En bacterias Gram negativas el autoinductor es principalmente acil homoserina lactona; mientras que en bacterias Gram positivas, el autoinductor está constituido de moléculas peptídicas (Lasa, 2014). Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación post-transcripcional del proceso de formación de biopelículas (Lasa, y col., 2005).

Por otro lado, estudios con técnicas moleculares por bloqueo de genes, como la mutagénesis de transposones aleatorios, han permitido identificar numerosos genes

involucrados en la formación de biopelículas. Tales genes incluyen aquellos que regulan o expresan proteínas de tipo adhesinas y apéndices tales como pili y flagelos; así como la expresión de enzimas involucradas en la síntesis y secreción de los componentes de la matriz de EPS. Sin embargo, no se previene la formación de biopelículas anulando un gen específico, sino que solo se retarda o se reduce su desarrollo (Brown, 2002).

La redundancia de las vías que están involucradas en la diferenciación de biopelículas podría reflejar la importancia fundamental de su formación. Uno de esos mecanismos aun no del todo elucidado en bacterias consiste en la regulación de la expresión génica mediante la metilación del ADN (Brown, 2002).

- Regulación de la expresión génica mediante la metilación del ADN.

La metilación del ADN consiste en la incorporación de un grupo bioquímico denominado metilo, de un sustrato donador de grupos metilo, a una secuencia específica de ADN, mediada por una enzima ADN metiltransferasa solitaria (Brown, 2002).

La metilación del ADN se ha observado en diversas especies de bacterias, algunos hongos, plantas y organismos superiores. En las bacterias, la metilación del ADN presenta diversas funciones, tales como mecanismo de defensa para reducir la cantidad de transferencia génica horizontal entre las especies, marcaje de ADN molde en replicación y reparación de errores, entre otros (Brown, 2002).

Se considera la metilación del ADN como un mecanismo epigenético. La epigenética se refiere a cambios heredables en la estructura y organización del ADN sin alteraciones en la secuencia del ADN que modulan la expresión génica. La modificación en la estructura y condensación de la cromatina por la metilación del ADN, ejerce efectos sobre la regulación de la expresión génica. En conjunto, este mecanismo epigenético implica cambios heredables en el fenotipo (García y col., 2011).

En enterobacterias, se ha descrito el papel de la metilación del ADN por la ADN adenina metiltransferasa (Dam) en la regulación de la expresión de diversos genes bacterianos relacionados con la virulencia, lo que sugiere que la metilación del ADN puede ser un regulador amplio y versátil de la expresión del gen de la virulencia. Por lo tanto, la enzima Dam tiene un impacto en la expresión génica diferencial en la patogenia de diversos microorganismos. La Dam incorpora grupo metilos en la base nitrogenada adenina en la secuencia GATC del ADN (Heussip y col., 2007).

La epigenética es ampliamente aplicable a muchos aspectos de la investigación biológica. El campo de la epigenética nutricional está dilucidando la naturaleza del gen nutriente. Las influencias de los nutrientes y los componentes bioactivos de los alimentos en fenómenos epigenéticos, como la metilación del ADN y varios tipos de modificaciones de histonas, se han investigado exhaustivamente. Los nutrientes pueden interactuar directa o indirectamente con los genes. Los cambios inducidos por nutrientes en la expresión génica pueden tener muchos resultados posteriores, lo que brinda apoyo para el papel de la nutrición en la adquisición de nuevos fenotipos (Choi y col., 2013).

En bacterias, un estudio reciente mostró que existen moléculas bioactivas presente en los alimentos que inhiben la formación de biopelículas y / o previenen la adhesión bacteriana (Miquel, 2016). Entre estas moléculas bioactivas están los grupos donadores de metilo.

- Colina como molécula bioactiva en los alimentos

Una fuente importante de grupos metilos lábiles es la colina (Figura 5), que está ampliamente disponible en la mayoría de los alimentos de origen vegetal y animal (Mateijan, 2018).

La colina es un precursor de la Betaína, un compuesto trimetilado del aminoácido glicina, que proviene de fuentes alimentarias como remolacha, hígado, huevos, pescado, legumbres y cereales integrales (Donkin, 2011).

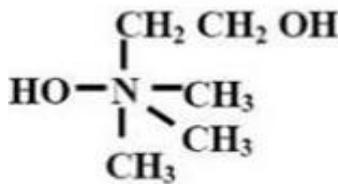


Figura5. Estructura química de la colina (Donkin, 2011).

El Brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) es una planta anual de la familia de las brassicáceas de crecimiento rápido, representa uno de los alimentos con un elevado contenido de colina, reportándose a una concentración de 182 mg de colina por 454 g brócoli (Drake, 2018).

Las biopelículas bacterianas son estructuras complejas responsables del 65% de las infecciones en humanos. Estas infecciones bacterianas asociadas a la formación de biopelículas son difíciles de erradicar y presentan episodios recurrentes debidos a la estructura particular de estas agrupaciones bacterianas recalcitrantes al tratamiento de agentes antimicrobianos (de la Fuente-Nuñez y col., 2013).

La actividad antibiopelícula que pudiera tener la colina como fuente de grupos metílicos lábiles presente en el brócoli ha generado un gran interés. A nivel nacional no se ha establecido un ensayo estandarizado para evaluar el efecto de extractos de brócoli en cepas de importancia clínica.

Es por ello que se evaluará el efecto de extractos de brócoli sobre la capacidad de formación de biopelículas de aislados bacterianos de origen clínico de *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens*, que han surgido como patógenos oportunistas problemáticos en las instituciones de salud.

3. ANTECEDENTES

3.1. Estudios a nivel internacional.

Se describió un tipo de morfología de colonias en el que las células de *Salmonella typhimurium* forman una red multicelular rígida con expresión de fimbrias agregantes delgadas que median estrechos enlaces intercelulares. Romling y colaboradores (2003) cultivaron las cepas en placas de ARC a diferentes temperaturas, con las que se determinó la presencia de fimbrias aglutinantes delgadas (curli), mostrando su alta dependencia de las condiciones ambientales. En este estudio se mostró que estas fimbrias podrían mediar en la adhesión superficial, mediante la penetración de la superficie del agar para establecer los enlaces intercelulares rígidos entre las células, formando así una capa superficial similar a la piel y contribuir con la motilidad superficial.

Se demostró que las condiciones de nutrientes afectan el morfotipo de biopelículas de *S. marcescens*. Bajo condiciones reducidas de carbono o nitrógeno, *S. marcescens* forma una biopelícula clásica que consiste en microcolonias. Rice y colaboradores (2005) determinaron que la formación de biopelículas en *S. marcescens* es un proceso dinámico que se controla mediante las señales de nutrientes y la detección del quórum sensing. Las biopelículas filamentosas de *S. marcescens* podrían convertirse en biopelículas de tipo microcolonia cambiando el medio después del establecimiento de las biopelículas. De manera similar, *S. marcescens* cuando se cultiva inicialmente como biopelículas de tipo microcolonia que, al aumentar la composición de nutrientes, puede cambiar de nuevo a biopelículas filamentosas.

La adherencia de cepas de *A. baumannii* a células epiteliales bronquiales humanas es un factor de virulencia importante, ya que es el paso inicial del proceso de colonización. Lee y colaboradores (2006) investigaron 37 cepas de *A. baumannii*, en sus

resultados observaron dos tipos de adherencia: una asociación dispersa de bacterias-células y la adherencia de grupos de bacterias sobre áreas localizadas de las células. Las bacterias con adherencia dispersa interactuaron con las células epiteliales a través de fimbrias, quedando atrapadas, además, por protrusiones que se extendían desde las células epiteliales. La adherencia cuantitativa varió considerablemente entre las cepas.

Se identificó fenotipos invasivos y virulentos, así como fenotipos no invasivos o avirulentos de cepas de *Shigella spp.* Martínez y colaboradores (2008) investigaron la presencia de plásmidos de virulencia en cepas de *Shigella spp* crecidas en placas de agar nutritivo suplementado con rojo congo al 0,025%. En las primeras, las colonias se observaron color rojo y las segundas mantuvieron su color blanquecino, comportamiento que se relacionó con la pérdida del fenotipo de virulencia acompañado de alteraciones moleculares en estos plásmidos.

Se evaluó el efecto del brócoli contra la infección por bacterias patógenas. Lee y colaboradores (2011) demostraron el efecto inhibitorio del extracto de brócoli en la detección de “quórum sensing” bacteriano utilizando *E. coli* como organismo modelo. Probaron tres compuestos flavonoides diferentes (quercetina, kaempferol y miricetina) que estaban presentes en el extracto de brócoli con el fin de obtener una mejor comprensión del compuesto inhibidor activo en el mismo. El análisis cuantitativo de PCR en tiempo real indicó que la quercetina fue la más activa entre los compuestos derivados de brócoli probados en la expresión negativa del gen de la virulencia; mientras que el tratamiento con miricetina, suprimió significativamente su expresión. Este estudio sugiere que el extracto de brócoli tiene el potencial de ser desarrollado como un agente anti-infeccioso.

Hassan y colaboradores (2011) sometieron un total de 110 aislados clínicos a tres métodos de detección de formación de biopelículas, placa de Cultivo Tisular (PCT), método Tubo (MT) y el método ARC. El método PCT se consideró superior a MT y ARC. Del total de 110 aislados clínicos, el método PCT detectó un 22.7% como alto, 41% moderado y 36.3% como productores débiles o no productores de biopelículas. El método PCT es un método cuantitativo y confiable para la detección de microorganismos formadores de biopelículas, en comparación con los métodos MT y ARC. El PCT puede recomendarse como un método general de detección de bacterias productoras de biopelículas en laboratorios.

Se demostró que un compuesto del té verde, la epigallocatequina-3-galato (EGCg) tiene propiedades inhibitorias y anti-biopelículas prometedoras contra la infección y biopelículas de *Stenotrophomonas maltophilia in vitro*. Vidigal y colaboradores (2014) demostraron que EGCg redujo significativamente los recuentos bacterianos de *S. maltophilia* en un modelo de infección aguda y de fibrosis quística, con ratones de tipo salvaje. Este compuesto natural puede representar un nuevo agente terapéutico contra la infección por *S. maltophilia* en la fibrosis quística. Los cambios cualitativos y cuantitativos en las biopelículas se evaluaron mediante microscopía de escaneo láser confocal (CLSM), el cual demostró que las biopelículas expuestas al EGCg exhibían un cambio en el biovolumen total o un aumento de la fracción de células muertas contenidas en biopelículas de manera dependiente de la dosis.

Se examinó la formación de biopelículas de 30 cepas de *S. marcescens* con tinción de Cristal Violeta (CV). Nandhagopal y colaboradores (2016) evaluaron el efecto de los factores ambientales en la formación de biopelículas en caldo nutritivo con diferentes temperaturas (temperatura del refrigerador, temperatura ambiente y 37 °C), a diferentes pH (4.5, 7.0 y 8.5) y con concentraciones variables de cloruro de sodio (0.5%,

1% y 2%). Las cepas produjeron más biopelícula a la temperatura del refrigerador que a temperatura ambiente y 37 °C. La producción de biopelícula a pH 4,5, 7 y 8,5 fue comparable, pero significativamente mayor a pH 4,5. Por otra parte, se reportó influencia de la sal cloruro de sodio en la formación de biopelículas. Al suplementar con 1% de cloruro de sodio, aumentó la formación de biopelículas; en cambio, con un 2% de cloruro de sodio, disminuyó.

3.2. Estudios a nivel nacional.

Ramos (2014) estandarizó un sistema de formación de biopelículas para cepas de *A. baumannii* y *S. maltophilia*. Las cepas a analizar se cultivaron sobre diferentes soportes: varillas de vidrio, cubreobjetos, portaobjetos y membranas de filtro tanto en medio líquido como en sólido con el propósito de observar cual es la superficie más idónea para el crecimiento de las mismas. Ramos (2014) sugiere que varillas de vidrio no son superficies adecuadas para la formación de biopelículas, y demostró poca presencia de células bacterianas y el grosor de la varilla impide que sean analizadas, para mayor detalle, en el microscopio. En membranas de filtro la formación de biopelícula ocurre en tan solo 48 horas y se pueden visualizar las estructuras características de las mismas. En cubre y portaobjetos en medio sólido se logra observar el desarrollo de la biopelícula, adicionalmente, se aprecia la formación de los canales por donde circula el agua y los nutrientes.

Puma (2015) catalogó 30 cepas de *A. baumannii* como formadoras de biopelículas fuertes para luego determinar el fenotipo resistencia a amikacina y tetraciclina de las mismas cepas creciendo en biopelícula, para ello se promovió la formación de estas asociaciones en microplacas de 96 pozos que posteriormente fueron expuestas a distintas concentraciones de los antibióticos.

En Venezuela no se han realizado estudios en relación al efecto del extracto de brócoli rico en colina sobre la formación de biopelículas de *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar los efectos de extractos de brócoli en la capacidad de formación de biopelículas de aislados bacterianos de origen clínico.

4.2. Objetivos específicos.

- 1) Determinar el morfotipo en colonias de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii* crecidas en Rojo Congo.
- 2) Evaluar el efecto de extractos de brócoli en el morfotipo de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii* crecidas en Rojo Congo.
- 3) Detectar formación de biopelículas de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii* en diferentes superficies.
- 4) Evaluar el efecto de extractos de brócoli en la formación de biopelículas de *Serratia marcescens* y *Acinetobacter baumannii* sobre diferentes superficies.
- 5) Comparar las técnicas de formación de biopelículas ensayadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico.

5.1.1. Cepas bacterianas.

Se trabajaron con punciones de aislados bacterianos de *A. baumannii* (Tabla 1) y *S. marcescens* (Tabla 2) provenientes de muestras clínicas de pacientes, admitidos y procesados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Centro Médico de Caracas.

Para todo paciente incluido en esta investigación, se mantuvo el nombre en el anonimato para garantizar su privacidad. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud para trabajos de investigación en seres humanos, la declaración de Helsinki, ratificada por la 52^a Asamblea General, Edimburgo, Escocia (Rothman, 2000) y el Código de Bioseguridad y Bioética de la República Bolivariana de Venezuela (MPPCTII, 2009).

Se contó con la colaboración del Dr. Alfonso Guzmán y el Dr. Manuel Guzmán, Jefes del Laboratorio, la Dra. Trina Navas y el respectivo personal (Lcdas en Bioanálisis: Adele Rizzi y Altagracia Merentes) para la obtención de las muestras bacterianas. Las muestras se encontraban disponibles en punción en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos IBE, UCV.

Tabla 1. Cepas de *Acinetobacter baumannii* provenientes de muestras clínicas.

Nº de registro de la cepa	Datos del paciente		Características de la toma de la muestra clínica	
	Edad	Sexo	Localización	Tipo de muestra
6596	47	M	Ambulatorio	Secreción inguinal
3988	54	M	Ambulatorio	Secreción de herida
7528	73	M	Hospitalización	Lavado bronquial
2317	2	M	Emergencia	Espujo
4848	71	M	Hospitalización	Flictena
5796	-	M	Ambulatorio	Úlcera
3910	27	F	Terapia de adultos	Secreción bronquial
4840	27	F	Terapia de adultos	Secreción bronquial

M: masculino; F: femenino; Edad reportado en años

Tabla 2. Cepas de *Serratia marcescens* provenientes de muestras clínicas.

Nº de registro de la cepa	Datos del paciente		Características de la toma de la muestra clínica	
	Edad	Sexo	Localización	Tipo de muestra
1315	80	M	Emergencia	Espujo
3710	88	M	Hospitalización	Espujo
7172	92	M	Terapia de adultos	Secreción bronquial
2344	78	F	Ambulatorio	Secreción de pie
4474	66	M	Ambulatorio	Orina
3018	62	F	Hospitalización	Secreción bronquial
6991	92	M	Emergencia	Espujo
4680	-	M	Ambulatorio	Secreción de talón

M: masculino; F: femenino; Edad reportado en años

Se empleó a *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1, control de cepa formadora de biopelículas fuerte previamente caracterizado en el Laboratorio de Biología de Plásmidos bacterianos, *Salmonella entérica typhimurium* (CVCM N° 2167), control de cepa que sintetiza fibra curli tipo amiloide y *Escherichia coli* HB101 (CVCM N° 77), control de cepa formadora de biopelículas débil. Todos los controles provienen del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), IBE.

Para evaluar el efecto de grupos donadores de metilos sobre la formación de biopelículas de las especies de estudio, se usó como control colina en solución acuosa al 50% (marca SIGMA).

5.2. Métodos.

5.2.1. Ensayos de formación de biopelículas.

5.2.1.1. Estandarización del medio agar rojo Congo.

Se determinó la capacidad de secreción de sustancias exopoliméricas en las 16 cepas de estudio de *A. baumannii* y de *S. marcescens*, evaluándose el morfotipo de sus colonias crecidas sobre agar rojo congo. Para ello, se estandarizó: la composición del medio, la cantidad de colorantes a emplear, la temperatura y tiempo de incubación.

Se tomó una alícuota de 1 mL de un cultivo bacteriano de 24 h, incubado a 37 °C crecido en Caldo Nutritivo (CN) marca OXOID (1 g de Extracto de carne, 2 g de Extracto de levadura en polvo, 5 g de peptonas y 5 g de Cloruro de sodio por 1 L de agua), se concentró colocándolo en un tubo eppendorf, al que luego se centrifugó por 1 minuto a 1600 g. Se descartó el sobrenadante y al mismo se le añadió 1 mL de solución salina (SS) 0,85% (m/v). El procedimiento se repitió dos veces. Luego se resuspendió en 100µL de SS y se sembró 10µL en gota en placas de Agar nutritivo, agar Rojo Congo (RC) y en agar Rojo Congo con Azul Coomassie (RC+AC). Se incubaron por 24, 48 y 72 h a 28 y 37°C. Culminado el período de incubación, se observaron los morfotipos de las colonias en lupa (marca Nikontype 104), se realizó el registro fotográfico y su descripción fenotípica (Romling y col, 1998).

El medio ARC se preparó con CN y agar al 2% (m/v), suplementado con rojo congo al 0,004% (m/v) y azul de Coomassie al 0,001% (m/v). La solución madre para ambos colorantes se preparó a una concentración de 0,2% (m/v), disueltos en etanol al 50% (v/v) (Gualdi y col., 2008).

5.2.1.2. Detección de biopelículas mediante ensayos *in vitro*, empleando superficies de vidrio.

1. Estandarización en tubos de ensayo.

Se inoculó una colonia de cada cepa bacteriana de estudio en 1 mL de CN contenido en tubos de ensayo, y se incubaron por 24, 48, 72 y 96 h a 28 y 37 °C.

Culminado el periodo de incubación, se descartó el medio de cultivo, y se agregó 1 mL de solución de CV al 0,01 % (m/v) para la tinción de las biopelículas adheridas a la superficie del tubo (Romling y col, 1998). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Luego, se descartó la solución de CV y se realizaron dos lavados con agua destilada. Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente en posición invertida durante 30 min (Heilmann et al., 1996).

Las biopelículas teñidas con CV en los tubos de vidrio, fueron clasificados cualitativamente de acuerdo al ancho del halo observado (biomasa aparente adherida a la superficie interna del tubo), como (Romling y col., 1998; Hassan y col., 2011):

- “0”: cepa no formadora de biopelículas.
No fue visible formación de biopelícula que cubriera la pared y el fondo del tubo.
- “1”: cepa formadora de biopelículas débil.
Se observó al menos un halo muy fino o parte de él.
- “2”: cepa formadora de biopelículas moderada.

Se observó un halo ancho discontinuo.

- “3”: cepa formadora de biopelículas fuerte.

Se observó un halo ancho y continuo.

2. Estandarización sobre varillas de vidrio en medio líquido.

Se inocularon las 16 cepas a evaluar en CN y se incubaron a 37 °C durante toda la noche, posteriormente se transfirieron 100 µL de cultivo a tubos de ensayo con 10 mL de CN que contenían varillas de vidrio (previamente esterilizadas). Los tubos se incubaron por 24, 48, 72 y 96 h a 28 °C y 37 °C. Este ensayo se realizó por triplicado.

Culminado el período de incubación, se descartó el medio de cultivo, se extrajo la varilla y se dejó secar en la estufa a 37 °C por 10 min. Las varillas fueron sumergidas en un recipiente con CV (0,01%) para su tinción y se dejó en reposo por 30min. Luego, se descartó el cultivo y se realizaron dos lavados con agua destilada. Las varillas se secaron en la estufa por 30 min.

Las biopelículas teñidas con CV, en las varillas de vidrio fueron clasificadas cualitativamente en función de la biomasa aparente adherida, tal como fue realizado con tubos de ensayos: “0” como cepa no formadora de biopelículas; “1” como cepa formadora de biopelículas débiles, “2” como cepa formadora de biopelículas moderadas y “3” como cepa formadora de biopelículas fuertes (Romling y col., 1998; Hassan y col., 2011).

5.2.2. Efecto del extracto de brócoli sobre *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680.

Se evaluó el efecto del extracto de brócoli sobre una cepa de cada especie de estudio (*A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680) que previamente se observaron constantes en su crecimiento y desarrollo de biopelículas sobre superficies de vidrio de tubos de ensayo y en ARC. Para ello, se extrajeron los compuestos bioactivos del brócoli.

5.2.2.1. Obtención de los compuestos bioactivos del brócoli.

Se empleó el protocolo descrito por Xiong y col., 2012. El brócoli se lavó con agua destilada y se trabajó con la porción densa de racimos verdes de capullos de flores comestibles, los cuales se trituraron en un mortero de porcelana. Se colocó 1 mL de brócoli triturado en tubos de ensayo, se cerró cada orificio con un tapón de algodón para evitar su dispersión y se procedió a la deshidratación del alimento en el liofilizador (marca Labconco, FreeZone 4.5).

Posteriormente, se procedió a extrajer los compuestos bioactivos de la muestra de brócoli liofilizada. Se prepararon dos extractos de brócoli, para ello, se tomaron 100 mg de brócoli liofilizado se resuspendió en 2 mL de Disolvente de Extracción (DE), que contiene cloroformo / metanol / agua, en una proporción de 1: 2: 0,8; y se homogenizó durante 5 minutos en un vórtex. Luego se centrifugó a 500 g durante 5 min. Se conservó el sobrenadante y se repitió el procedimiento dos veces con el sedimento. Los tres sobrenadantes resultantes se unieron en un mismo tubo de ensayo, al cual se le agregó metanol hasta un volumen final de 10 mL, siendo uno de los dos extractos de estudio (Ext1- Diluido). Para la obtención del segundo extracto de los compuestos bioactivos del brócoli (Ext2- Concentrado), se repite el procedimiento, pero no se procede a diluir el sobrenadante resultante en metanol hasta un volumen final de 10 mL. Ambos

extractos se almacenaron a 4 °C. Para esterilizar el extracto de brócoli se debe filtrar, debido a que es un compuesto orgánico. Trabajar en condiciones de esterilidad. Agitar antes de suplementar al medio.

5.2.2.2. Efecto del extracto de brócoli sobre el crecimiento bacteriano.

Se procedió a evaluar si las muestras de los extractos de brócoli obtenidos afectan el crecimiento bacteriano. Se emplearon se suplementaron en 5 mL de CN. Por los extractos, se tienen concentraciones de compuestos bioactivos de brócoli relativas de: 1 y 2,5 mg/mL, respectivamente. Se estudiaron los cambios en la curva de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia de los extractos de los dos extractos de brócoli. Se determinaron los valores de crecimiento bacteriano por densidad óptica (DO) y la viabilidad celular por titulación en gota. Para aquellos valores de DO que fueron superiores a uno se realizó una dilución $\frac{1}{5}$.

1. Curva de crecimiento bacteriano.

Se inocularon las cepas de estudio en 5 mL de medio de cultivo, y se realizaron lecturas de DO a una λ de 600 nm en un espectrofotómetro (EppendorfBiophotometer®) a los 30 minutos, luego cada hora durante las primeras siete horas y a las 24 horas. Para cada tiempo, se tomaron 200 μ L del medio en crecimiento y se midió la DO. Con los datos obtenidos, se realizó la curva de crecimiento bacteriano DO vs tiempo.

2. Viabilidad celular por titulación en gota.

La titulación en gota se empleó para el conteo de células viables de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680, en la curva de crecimiento. Se realizó el conteo de células vivas a partir de sus unidades formadoras de colonias (UFC), crecidas sobre AN.

Para ello, se tomaron alícuotas en cada hora de lectura de la curva de crecimiento, se hicieron diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} en SS al 0,85 % (m/v) y se sembraron por quintuplicado, utilizando un volumen de 10 μ L por gota, en placas de AN.

Para las diluciones 1/100 se colocaron en tubos eppendorf 500 μ L de SS (5 μ L del cultivo puro) y para las diluciones 1/10 se colocaron 450 μ L SS (50 μ L del cultivo puro).

Se incubaron las placas de AN a 37 °C por 24 h. Se tomaron en cuenta aquellas siembras de gotas en donde se observó más de 5 UFC y menos de 50 UFC. El número de colonias viables se obtuvo calculando el promedio de cada dilución en las réplicas realizadas, y el título se calculó con la Ecuación 1.

$$\text{Título (UFC. mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{UFC} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de siembra (mL)}}$$

Ecuación 1. Fómula del Título bacteriano, expresado como UFC: Unidades formadoras de colonias /volumen de siembra (Madigan, 2009).

5.2.2.3. Efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 sobre diferentes superficies.

Para estos ensayos se empleó una concentración de 2,5 mg/mL del extracto de brócoli diluido. Como control positivo del efecto de grupos donadores de metilos sobre

la formación de biopelículas, se suplementó colina (marca SIGMA) en solución acuosa al 50% (2,5 mg/mL) en CN.

Antes de evaluar formación de biopelículas de las cepas de estudio se estudiaron nuevamente los cambios en la curva de crecimiento bacteriano de las mismas cepas *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680, en ausencia y en presencia de los dos extractos de brócoli y colina (2,5 mg/mL). Se determinaron los valores de crecimiento bacteriano por DO y la viabilidad celular por titulación en gota.

1. Ensayos de formación de biopelículas *in vitro* en tubos de ensayo.

Se inocularon las cepas bacterianas *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 en 1 mL de CN. Como control formador de biopelículas fuerte se empleó *P. aeruginosa* MPAO1 y como control formador de biopelículas débil se empleó *E.coli* HB101.

Para la cepa de *A. baumannii* 5796, los medios fueron incubados por 48 h y para *S. marcescens* 4680 por 72 h, ambas a una temperatura de 37 °C. Culminado el periodo de incubación, se descartó el medio de cultivo y se agregó 1 mL de CV al 0,01 %, para la tinción de las biopelículas adheridas a la superficie del tubo. Se incubó 30 min. Luego, se descartó el CV y se realizaron dos lavados con agua desionizada. Los tubos se dejaron secar en posición invertida por 30 min a temperatura ambiente.

De igual manera como se procedió con los experimentos anteriores, las biopelículas teñidas en los tubos de vidrio fueron clasificados cualitativamente en función de la biomasa aparente adherida: “0” cepa no formadora de biopelículas; “1” cepa formadora de biopelículas débiles, “2” cepa formadora de biopelículas moderadas y “3” cepa formadora de biopelículas fuertes (Romling y col., 1998; Hassan y col., 2011).

2. Ensayos de formación de biopelículas *in vitro* sobre agar rojo congo.

Se determinó la capacidad de secreción de exopolímeros en las cepas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680, evaluándose el morfotipo de sus colonias crecidas sobre ARC en las condiciones establecidas. Como control positivo de secreción de fibra curli tipo amiloide se utilizó *S. typhimurium* (CVCM N° 2167) y como control negativo de secreción de fibra curli tipo amiloide *E.coli* HB101 (CVCM N° 77) (Zhou y col., 2013).

De la misma manera en la que se procedió en la estandarización del medio ARC, se tomó una alícuota de 1 mL de un cultivo bacteriano de 24 h, incubado a 37 °C crecido en CN, se concentró colocándolo en un tubo eppendorf, al que luego se centrifugó por 1min. a 1600 g. Se descartó el sobrenadante y al sedimento se le añadió 1 mL de SS 0,85% (m/v). El procedimiento se repitió dos veces más.

Luego, el sedimento se resuspendió en 100µL de SS y se sembró 10µL en gota en placas de agar RC+AC en ausencia y presencia del extracto de brócoli diluido en metanol a 2,5 mg/mL. Luego, las placas de ARC sembradas se incubaron a 24 h a 37 °C. Culinado el período de incubación, se observaron las características morfológicas de las colonias en lupa (marca Nikontype 104), se realizó el registro fotográfico y su descripción fenotípica (Romling y col, 1998).

5.2.3. Análisis estadístico.

Para cada tiempo de ensayo (2, 4, 6, 24, 48 y 72 h) se buscó si existe diferencia significativa entre los tratamientos (Caldo nutritivo o µ1, Extracto de brócoli o µ2 y Colina o µ3).

Los datos de crecimiento y título bacteriano se expresan como media. Para analizar los datos se realizó un diseño de experimento unifactorial (Factor: tiempo determinado) con análisis final del contraste de hipótesis entre las diferencias de medias con la diferencia

discriminante, prueba LSD restrictivo LSD de Fisher. Se utilizó Microsoft Excel como hoja de cálculo.

5.2.3.1. Prueba LSD (Least significant difference) de Fisher.

Es una prueba de comparaciones múltiples. Esta técnica solo se puede utilizar si el anova F es significativo. La idea principal del LSD es calcular la diferencia significativa más pequeña entre dos medios, como si estos medios hubieran sido los únicos medios para ser comparados y ver cual es significativo (Lynne y Hervé, 2010).

A continuación, se explica brevemente el procedimiento que se realizó:

1. Análisis de la tabla ANOVA en función del p-valor (probabilidad) resultante, la cual menciona si existe o no diferencia significativa entre algunos de los tratamientos. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.
2. Si existe diferencia significativa entre los tratamientos emparejadas, se basa en el contraste de hipótesis t-student la cual menciona a través del p-valor resultante la diferencia significativa entre tratamientos.
3. Si es así, se aplica la diferencia discriminante (LSD) para visualizar cuál de las parejas posee el valor mayor del valor absoluto de las diferencias de medias de los tratamientos, es la selección del tratamiento recomendado y que genera la mayor diferencia significativa.

5.2.3.2. Diseño estadístico.

Análisis de la varianza bajo el supuesto de:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$$

H1: Al menos una de ellas es distinta.

- En caso de generar un p-valor fuera de la región crítica, implica como resultado final- *“No existen elementos suficientes para rechazar la Hipótesis nula”*-, por lo tanto, no existiría entre los tratamientos (en un tiempo determinado) diferencia significativa en al menos un tratamiento.
- En otro caso, si el p-valor arroja un resultado dentro de la región crítica, implica que se rechaza de forma inmediata la hipótesis nula, por ende *“Existe al menos uno de los tratamientos que es significativamente distinto de los otros”*, por lo tanto, posterior al presente resultado, se realiza la prueba LSD, la cual se desarrolla con el objetivo de analizar entre las medias emparejadas cuál o cuáles son los tratamientos determinados que generan mayor diferencia significativa.

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de la morfología de colonias de *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens* crecidas sobre agar rojo congo.

Se realizó la estandarización de la técnica de ARC, evaluando los morfotipos que adquieren las 16 cepas de estudio (Tabla 1 y 2). Se emplearon dos medios de cultivos: 1) Agar nutritivo suplementado con el colorante Rojo Congo 0,004 % (m/v) y 2) Agar nutritivo suplementado con los colorantes Rojo congo 0,004 % (m/v) y Azul coomassie 0,001 % (m/v).

Para ambos medios de prueba (AN+RC y AN+RC+AC), a las temperaturas (28 y 37°C) y tiempos ensayados (24, 48, 72 y 96 h) se observó un halo rojo acentuado en la cepa control *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 como formadora de biopelículas fuertes; en cambio, la cepa control de *Escherichia coli* HB101 como formadora de biopelículas débiles, se observó un halo rosado, tal como se muestra en la Figura 6.

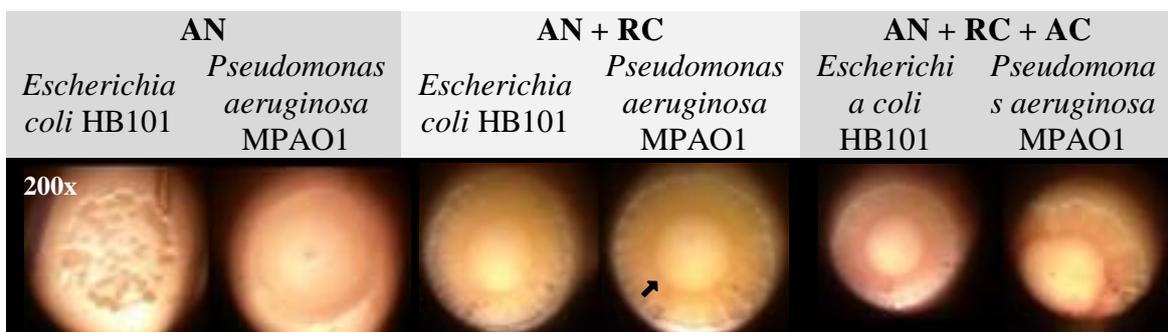


Figura 6. Morfología de las colonias de las cepas controles de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 y *Escherichia coli* HB101 sobre ARC incubada por 24 h a 28 °C. AN: Agar nutritivo. RC: Rojo congo. AC: Azul coomassie. Flecha negra: Halo rojo que se distingue en colonias de la cepa formadora de biopelículas fuertes, MPAO1.

Se observó y reportó la morfología de colonias características de las 16 cepas de estudio: borde, textura y color, presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Características morfológicas de las colonias de las cepas bacterianas de *A. baumannii* y *S. marcescens*, provenientes de muestras clínicas crecidas sobre agar rojo congo.

Características fenotípicas evaluadas	<i>A. baumannii</i>		<i>S. marcescens</i>	
	Composición del agar		Composición del agar	
	AN+RC	AN+RC+AC	AN+RC	AN+RC+AC
Borde	2 Definidos, 6 estriados	Estriado	Grueso definido	Delgado definido
Textura	Lisa	4 Lisas, 4 rugosa	Lisa	Rugosa
Color	4 Rosadas, 4 Blancas	4 Rosadas, 4 Blancas	Rosado	Rosado

AN: agar nutritivo, RC: rojo congo 0,004 % (m/v), AC: azul coomassie 0,001 % (m/v).

6.1.1. Morfología de colonias de *A. baumannii* crecidas sobre agar rojo congo.

La textura y bordes de las cepas de *A. baumannii* varían en función de los colorantes suplementados en el medio de cultivo. Las cepas N° 6596 y 4840 de *A. baumannii* crecidas sobre AN suplementado con RC, se les distinguió un borde lineal definido, mientras que las cepas N° 3988, 7528, 2317, 4848, 5796 y 3910 se distinguieron con pequeñas invaginaciones (estriado), todas con textura lisa (Tabla 3).

Las colonias formadas sobre el AN suplementado con RC+AC, se observó que las ocho cepas de *A. baumannii* presentaron un borde estriado con pequeñas invaginaciones. En cuanto a la textura, se observó que las cepas N° 3988, 4848, 3910 y 4840 presentaron una textura lisa; mientras que las cepas N° 6596, 7528, 2317 y 5796 manifestaron una textura rugosa. En la figura 7 se muestra la cepa de *A. baumannii* 3910, que representa un ejemplo de las distintas características adquiridas en borde y textura en las 8 cepas de *A. baumannii* provenientes de muestras clínicas, en los distintos medios de ensayo.

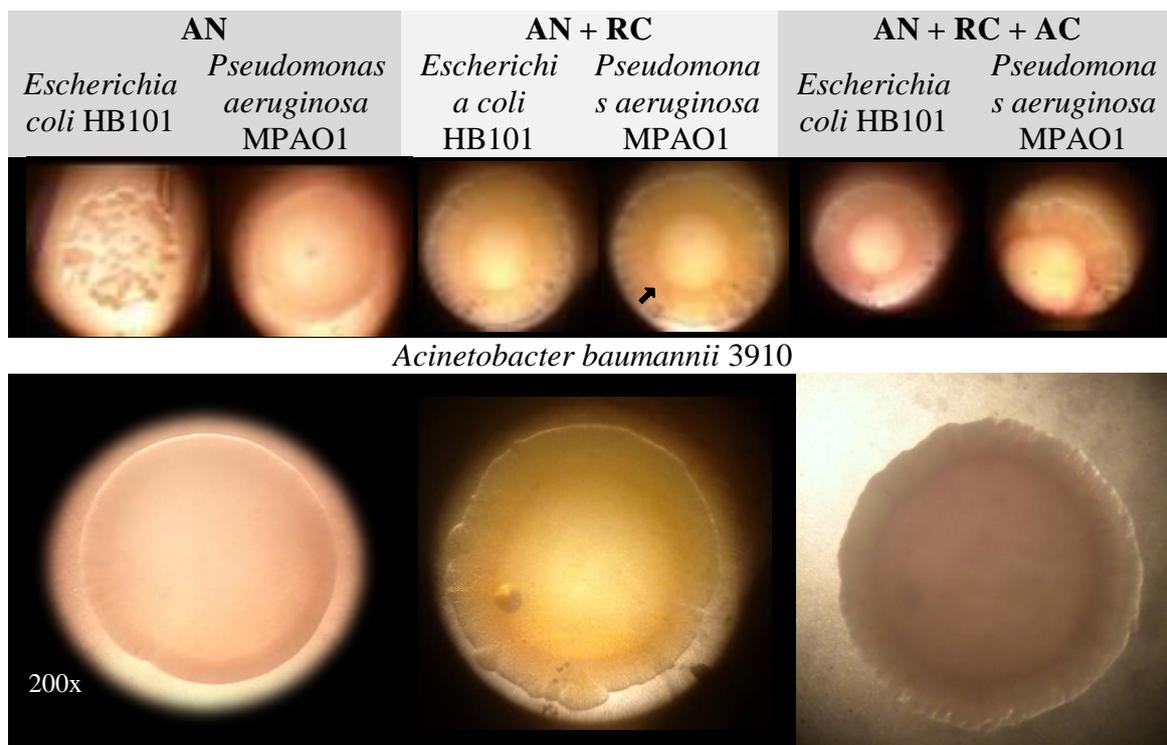


Figura7. Morfología de las colonias de la cepa bacteriana *A. baumannii* 3910 sobre ARC, incubada por 24 h a 28 °C.

Morfología de *A. baumannii* 3910 en tres medios de cultivo: AN (izq.), RC (centro) y RC+AC (der.). Panel superior: Controles a 28 °C en 24 h. Flecha negra: Halo rojo que se distingue en la colonia de la cepa formadora de biopelículas fuertes, MPAO1. AN: Agar nutritivo. RC: Rojo congo. AC: Azul coomassie.

En cuanto al color adquirido de las colonias crecidas en AN suplementados con distintos colorantes, se obtuvo que las cuatro cepas de *A. baumannii* N° 6596, 2317, 7528 y 5796 crecidas tanto en AN + RC como en AN + RC + AC, se observaron blancas (Figura 8), lo que significa que estas últimas no fijaron el rojo congo; las cuatro cepas restantes (N° 3988, 4848, 3910 y 4840), se observaron rosadas en ambos medios, en AN+RC y AN+RC+AC.

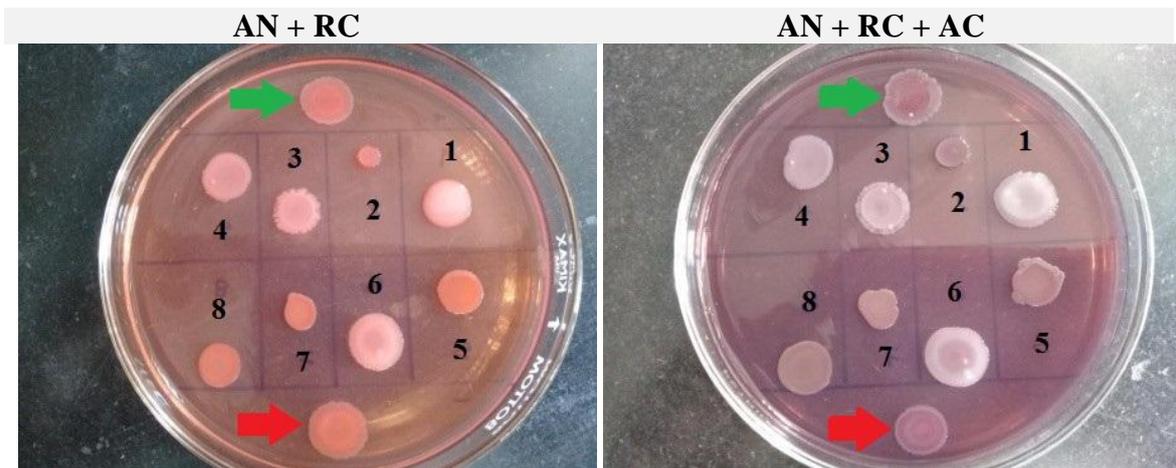


Figura 8. Morfología de las colonias de las 8 cepas de *A. baumannii* provenientes de muestras clínicas crecidas sobre AN+RC y en AN+RC+AC incubado a 37 °C por 24 h. Se designan los números de las cepas de *A. baumannii*; 1:6596, 2:3988, 3: 7528, 4:2317, 5:4848, 6:5796, 7:3910 y 8:4840. Control de cepa formadora de biopelículas fuertes: *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 (flecha verde). Control de cepa formadora de biopelículas débiles: *Escherichia coli* HB101 (flecha roja). Se distingue el color de las colonias de las cepas de *A. baumannii* crecidas en AN+RC y en AN+RC+AC.

6.1.2. Morfología de colonias de *S. marcescens* crecidas sobre agar rojo congo.

Las colonias de las ocho cepas de *S. marcescens* crecidas en AN suplementado con RC, se observaron de color rosado, presentaron bordes definidos, con un determinado grosor y textura lisa (Figura 9).

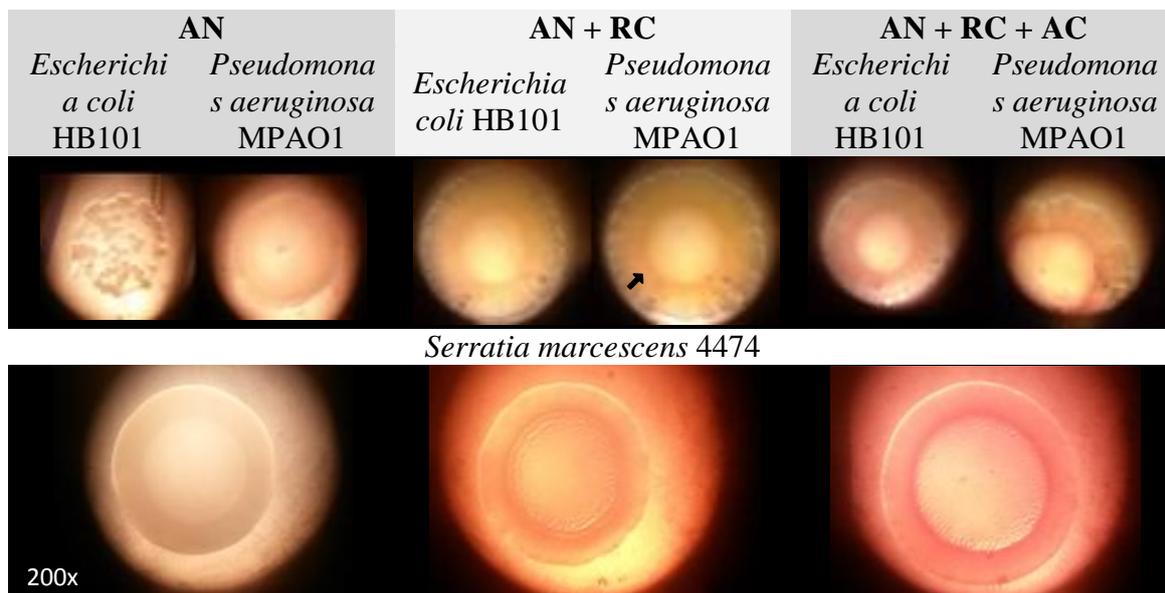


Figura9. Morfología de las colonias de la cepa bacteriana *S. marcescens* 4474 sobre ARC, incubada por 24 h a 37 °C.

Morfología de *S. marcescens* 4474 en tres medios de cultivo: AN (izq.), AN + RC (centro) y AN + RC+AC (der.). Panel superior: Controles a 28 °C en 24 h. Flecha negra: Halo rojo que se distingue en la colonia de la cepa formadora de biopelículas fuertes, MPAO1. AN: Agar nutritivo. RC: Rojo congo. AC: Azul coomassie.

En el medio de AN+RC+AC, las colonias de las ocho cepas de *S. marcescens* se observaron con un borde de delgado grosor y textura rugosa. Todas las cepas *S. marcescens* se manifestaron como colonias rosadas.

Se debe tomar en cuenta que las cepas 7172, 6991 y 4680 de *S. marcescens* secretan prodigiosina a 28 °C, mas no a 37 °C (figura 10), por tratarse de un pigmento rojo característico de la especie (Carrillo, 2015), puede afectar la evaluación cualitativa en Agar RC, sobrestimando los resultados y aquí la importancia de incubarlas también en AN como control de dicho parámetro.

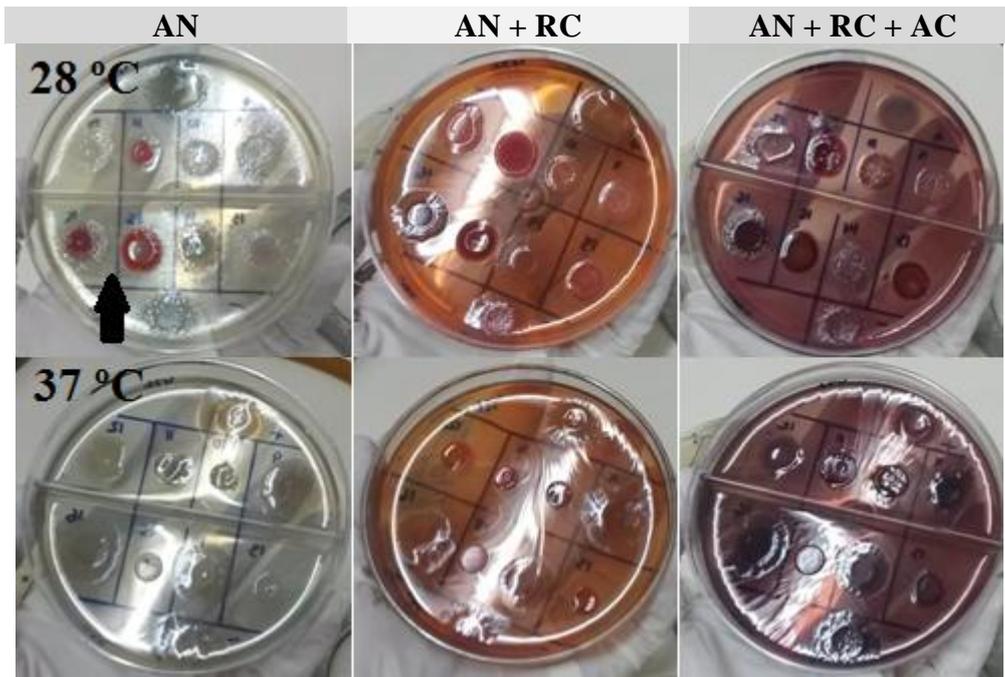


Figura10. Secreción de prodigiosina en colonias de cepas de *S. marcescens* provenientes de muestras clínicas a 72 h sobre AN, AN+RC y AN+RC+AC. Panel superior. 28 °C. Panel inferior. 37 °C. AN: agar nutritivo, RC: rojo congo y AC: azul coomassie. Flecha negra. Secreción del pigmento rojo, prodigiosina.

El ensayo ARC se evaluó, además, el tiempo y la temperatura de incubación. Se determinó que la morfología de colonias no varía en los tiempos ensayados. En cuanto a la temperatura, no hubo distinción.

En síntesis, el medio AN + RC 0,004 % (m/v) + AC 0,001 % (m/v) permitió distinguir mejor las características borde, textura y color en los 16 aislados de estudio a 37 °C por 24 h de incubación.

6.2. Detección de formación de biopelículas de *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens* sobre superficie de vidrio.

Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas mediante el método de detección CV en tubos de ensayo de las 16 cepas de estudio a 28 y 37 °C, en cuatro tiempos propuestos (24, 48, 72 y 96 h).

El método de detección de formación de biopelículas con CV en tubos de ensayo fue descrito por Christensen y colaboradores (1982). Para efectos de este estudio, la formación de biopelículas se consideró visible cuando cubría la pared y el fondo del tubo, tal como se observó en *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 como formador de biopelículas fuerte. En cambio, en *Escherichia coli* HB101, como formador de biopelículas débil, no se observaron biopelículas visibles que cubrieran la pared ni el fondo del tubo (figura 11).



Figura11. Cepas controles de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1 y *Escherichia coli* HB101 sobre superficie de tubos de ensayo incubadas a 37 °C, 48 h.

Las biopelículas teñidas con CV en los tubos de vidrio fueron clasificadas cualitativamente de 0 a 3 según Romling y col., 1998 y Hassan y col., 2011, en función de la biomasa aparente adherida (figura 12).

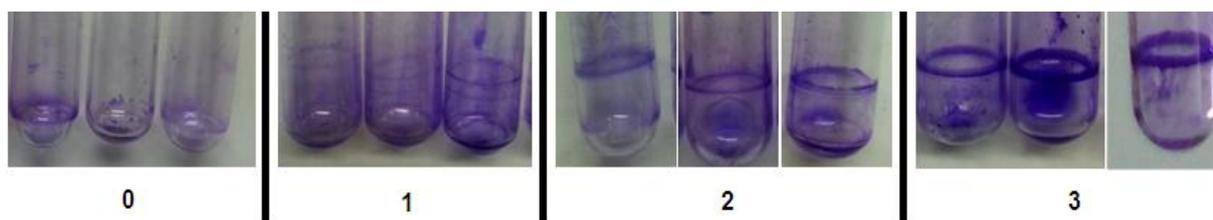


Figura12. Clasificación cualitativa de biopelículas bacterianas formadas en función de la biomasa adherida en tubos de ensayo.

“0” cepa no formadora de biopelículas (*E. coli* HB101, 72 h 37 °C); “1” cepa formadora de biopelículas débiles (*S. marcescens* 6991, 72 h 37 °C); “2” cepa formadora de biopelículas moderadas (*A. baumannii* 7528, 72 h 37 °C) y “3” cepa formadora de biopelículas fuertes (*P. aeruginosa* MPAO1, 96 h 37 °C).

6.2.1. Formación de biopelículas de *A. baumannii* en tubos de ensayo.

Las biopelículas de las ocho cepas de *A. baumannii* formadas a 28 °C, se clasificaron como débiles y moderadas, independientemente del tiempo de incubación (tabla 4). La cepa *A. baumannii* 5796 destaca por formar biopelículas moderadas en los tres tiempos de estudio (24, 48 y 96 h).

Tabla 4. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de *A. baumannii* provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 28 °C

Tiempo (h)	MPAO1	HB101	Cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de muestras clínicas							
			6596	3988	7528	2317	4848	5796	3910	4840
24	3	2	0	0	1	1	1	2	2	2
48	2	0	1	1	2	2	2	2	1	1
72	2	0	0	0	1	2	2	1	1	2
96	1	0	2	1	1	0	0	2	1	1

h: horas, (MPAO1): *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1, cepa control formadora de biopelículas fuertes, (HB101): *Escherichia coli* HB101, cepa control formadora de biopelículas débiles. Clasificación de biopelícula aparente formada: 0- No formadora de biopelículas, 1- Formadora de biopelículas débil, 2- Formadora de biopelículas moderada, 3- Formadora de biopelículas fuerte (Hassan y col., 2011).

De manera similar, la biomasa de biopelículas formadas por las cepas de estudio de *A. baumannii* a 37 °C (Tabla 5) fueron clasificadas entre débiles y moderadas. La cepa *A. baumannii* 5796 destaca por formar biopelículas moderadas en los cuatro tiempos de estudio (24, 48, 72 y 96 h).

Tabla5. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de *A. baumannii* provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 37 °C.

Tiempo (h)	MPAO1	HB101	Cepas de <i>A. baumannii</i> provenientes de muestras clínicas							
			6596	3988	7528	2317	4848	5796	3910	4840
24	2	1	0	1	1	1	0	2	2	2
48	2	0	1	1	1	1	1	2	2	1
72	2	0	0	1	1	2	1	2	1	1
96	3	0	1	1	1	2	0	2	1	1

h: horas, (MPAO1): *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1, cepa control formadora de biopelículas fuertes, (HB101): *Escherichia coli* HB101, cepa control formadora de biopelículas débiles. Clasificación de biopelícula aparente formada: 0- No formadora de biopelículas, 1- Formadora de biopelículas débil, 2- Formadora de biopelículas moderada, 3- Formadora de biopelículas fuerte (Hassan y col., 2011).

En las tablas 4 y 5, se observan que no hay una relación directamente proporcional entre la biomasa de biopelículas formadas y el tiempo de incubación. Además, todas las cepas de estudio de *A. baumannii* formaron biopelículas a las 48 h de incubación fueran débiles o moderadas, independientemente de la temperatura de ensayo.

6.2.2. Formación de biopelículas de *S. marcescens* en tubos de ensayo.

Las biopelículas formadas de las cepas de *S. marcescens* a 28 °C (Tabla 6) fueron entre débiles y moderadas, independientemente del tiempo de incubación. La cepa de *S. marcescens* 4680 destaca por formar biopelículas moderada en tres tiempos de estudio (24, 48 y 72 h).

Tabla 6. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de *S. marcescens* provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 28 °C.

Tiempo (h)	MPAO1	HB101	Cepas de <i>S. marcescens</i> provenientes de muestras clínicas							
			1315	3710	7172	2344	4474	3018	6991	4680
24	3	2	1	2	2	1	1	1	2	2
48	2	0	0	0	1	1	1	1	1	2
72	2	0	2	1	2	1	2	2	2	2
96	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1

h: horas, (MPAO1): *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1, cepa control formadora de biopelículas fuertes, (HB101): *Escherichia coli* HB101, cepa control formadora de biopelículas débiles. Clasificación de biopelícula aparente formada: 0- No formadora de biopelículas, 1- Formadora de biopelículas débil, 2- Formadora de biopelículas moderada, 3- Formadora de biopelícula fuerte (Hassan y col., 2011).

Los ensayos realizados a 37 °C, las cepas de *S. marcescens* formaron biopelículas débiles y moderadas (Tabla 7), coincidiendo con la clasificación general de las biopelículas formadas a 28 °C. La cepa de *S. marcescens* 4680 destaca por formar biopelículas moderadas en los cuatro tiempos de estudio (24, 48, 72 y 96 h).

Tabla 7. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas de *S. marcescens* provenientes de muestras clínicas en tubos de ensayo a 37°C.

Tiempo (h)	MPAO1	HB101	Cepas de <i>S. marcescens</i> provenientes de muestras clínicas							
			1315	3710	7172	2344	4474	3018	6991	4680
24	2	1	1	1	1	1	0	1	1	2
48	2	0	1	1	2	1	0	1	1	2
72	2	0	1	1	2	1	2	1	1	2
96	3	0	1	1	0	1	1	0	1	2

h: horas, (MPAO1): *Pseudomonas aeruginosa* MPAO1, cepa control formadora de biopelículas fuertes, (HB101): *Escherichia coli* HB101, cepa control formadora de biopelículas débiles. Clasificación de biopelícula aparente formada: 0- No formadora de biopelículas, 1- Formadora de biopelículas débil, 2- Formadora de biopelículas moderada, 3- Formadora de biopelículas fuerte (Hassan y col., 2011).

En las Tablas 6 y 7 se observan que no hay relación directa entre la biomasa aparente de biopelículas formadas y el tiempo de incubación. Todas las cepas de *S. marcescens* formaron biopelículas a las 72 h de incubación, independientemente de la temperatura.

De acuerdo a los resultados obtenidos, ambas especies de estudio, *A. baumannii* y *S. marcescens* son productores de biopelículas moderadas, a las 48 y 72 h de incubación, a 37 °C.

6.2.3. Formación de biopelículas de *A. baumannii* y *S. marcescens* sobre varillas de vidrio.

Sobre varillas de vidrio no se distingue un patrón de formación de biopelícula de alguna de las especies de estudio, *A. baumannii* y *S. marcescens*. En ninguno de los casos ensayados parece no haber adhesión (Figura 13).

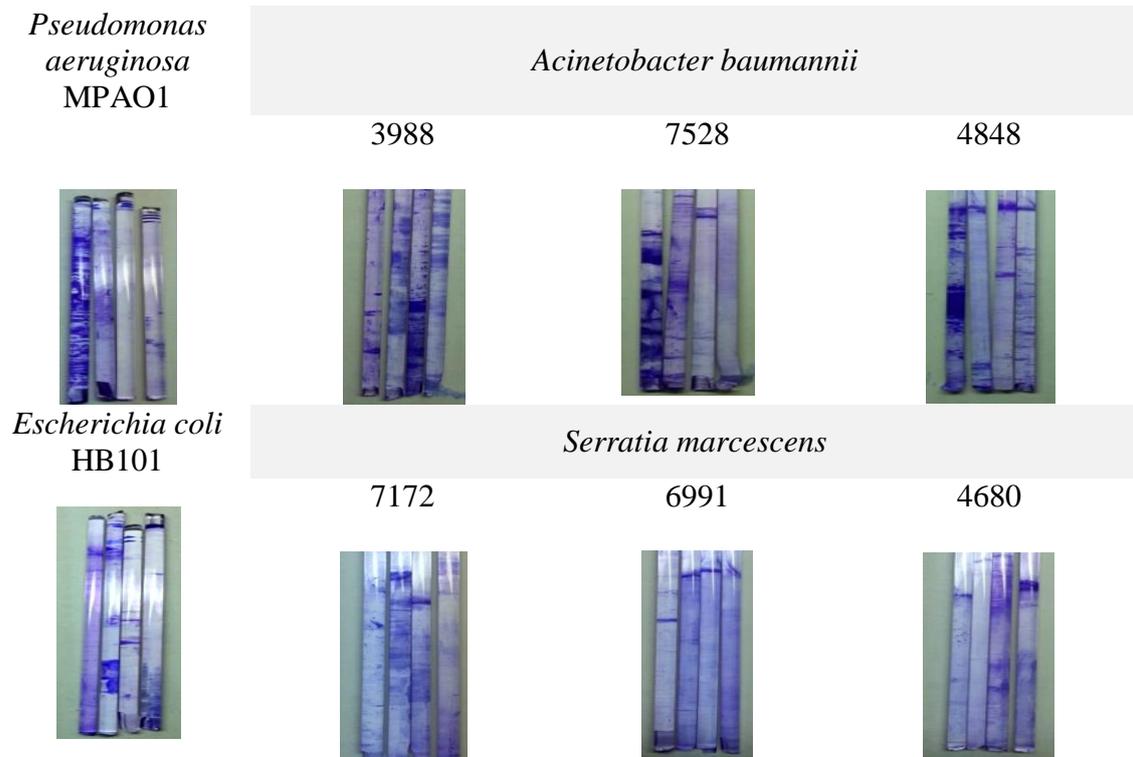


Figura13. Formación de biopelículas de cepas de *A. baumannii* y *S. marcescens* provenientes de muestras clínicas sobre varillas de vidrio incubadas a 28 °C. 4 varillas por cepas, de izquierda a derecha (24, 48, 72 y 96 h de incubación).

6.3. Efecto del extracto de brócoli sobre *Acinetobacter baumannii* 5796 y *Serratia marcescens* 4680.

Se realizó el protocolo de Xiong, 2012 que valida la obtención de colina libre y compuestos relacionados, se prepararon dos extractos de brócoli, uno diluido en metanol (extracto de brócoli diluido o Ext1) y otro concentrado en el disolvente de extracción (extracto de brócoli concentrado o Ext2).

Antes de evaluar el efecto de los extractos de brócoli sobre la formación de biopelículas de las cepas de estudio, se consideró importante evaluar su efecto sobre el crecimiento bacteriano de las cepas *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680, ya que entre todas las cepas de estudio destacaron por formar biopelículas moderadas en todos los tiempos y temperaturas evaluadas.

6.3.1. Efecto del extracto de brócoli sobre el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680.

Se evaluó el efecto de los extractos de brócoli preparados (diluido y concentrado) y de las soluciones en las que se encuentran diluido y concentrado respectivamente (metanol y disolvente de extracción), a dos concentraciones 1 y 2,5 mg/mL sobre el crecimiento bacteriano de las cepas *A. baumannii* 5796 y de *S. marcescens* 4680. Los datos reportados corresponden a un único valor de experimento. Se graficó la curva de crecimiento bacteriano del Ln (DO) vs tiempo.

6.3.1.1. Efecto del extracto de brócoli sobre el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796.

En la tabla 8 se observa que, al incrementar la concentración del Ext1 (de 1 a 2,5 mg/mL), disminuyen los valores de DO con respecto a los controles (metanol y disolvente de extracción). En cambio, al incrementar la concentración del Ext2 (de 1 a 2,5 mg/mL), aumentan los valores de DO con respecto a los controles (metanol y disolvente de extracción).

Tabla 8. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre el crecimiento bacteriano de *A.baumannii* 5796.

DO a una $\lambda = 600$ nm									
Tiempo (h)	Extracto de brócoli diluido en metanol					Extracto de brócoli concentrado			
	CCN	CME	Ext1	CME	Ext1	CDE	Ext2	CDE	Ext2
		1	1	2,5	2,5	1	1	2,5	2,5
		mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
0,5	0,133	0,201	0,300	0,151	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,450	0,531	0,600	0,509	0,300	0,025	0,000	0,000	0,000
2	0,616	0,691	0,846	0,675	0,326	0,035	0,030	0,015	0,070
3	0,693	0,812	0,986	0,798	0,418	0,050	0,035	0,030	0,142
4	0,831	0,967	1,219	1,948	0,461	0,061	0,040	0,040	0,165
5	0,976	1,123	1,444	1,043	0,547	0,073	0,050	0,040	0,173
6	1,101	1,291	1,850	1,243	0,632	0,074	0,061	0,051	0,198
7	1,204	1,460	2,002	1,423	0,780	0,078	0,183	0,190	0,283
24	5,428	4,653	5,635	5,050	5,967	0,025	0,133	0,015	0,236

h: horas, DO: Densidad óptica, CCN: Control del crecimiento de *A. baumannii* 5796 en caldo nutritivo, CME: Control del crecimiento de *A. baumannii* 5796 en CN suplementado con metanol, CDE: Control del crecimiento de *A. baumannii* 5796 en CN suplementado con disolvente de extracción.

Se registró que el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796 en presencia del metanol y en presencia del Ext1 (ambas a 1 mg/mL) son similares al crecimiento bacteriano en caldo nutritivo no suplementado (Figura 14A). En cambio, en la figura 14B el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796 en presencia del extracto de brócoli 2,5 mg/mL disminuye y se distingue del crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796 en presencia del metanol a la misma concentración.

En la figura 14C y 14D, el crecimiento bacteriano de *A. baumannii*5796 en presencia del Ext2 es similar al crecimiento bacteriano de *A. baumannii*5796 en

presencia del disolvente de extracción (ambas a 1 y 2,5 mg/mL) aunque, con respecto a la curva de crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796 en CN sin suplementar resultaron distintas.

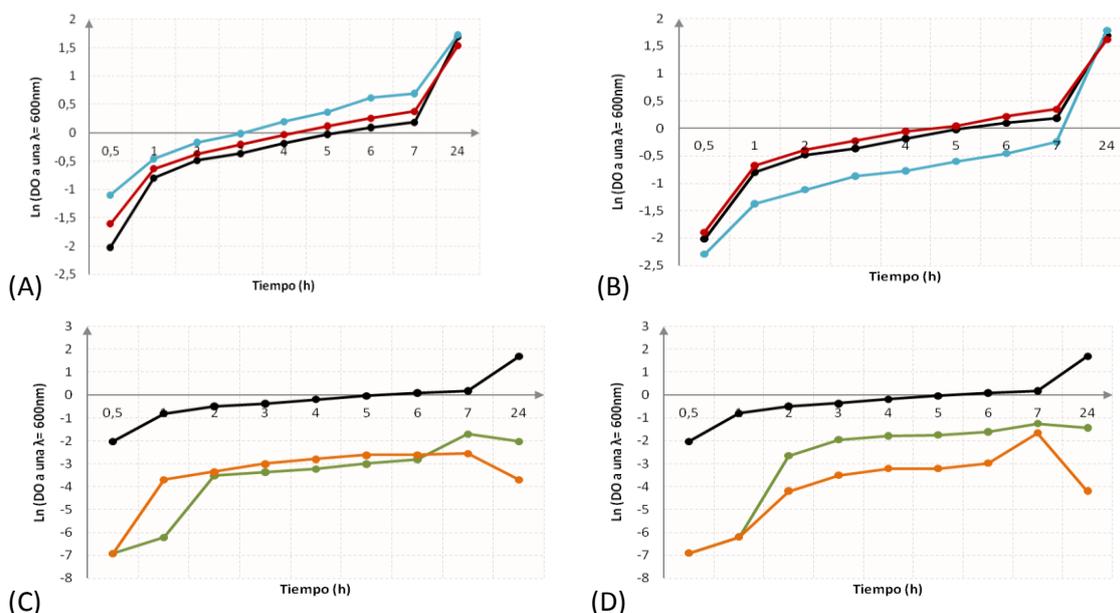


Figura 14. Curvas de crecimiento bacteriano de *A.baumannii* 5796 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción. Curva negra, control CN sin suplementar de *A.baumannii* 5796. Curva roja, CN suplementado con metanol. Curva naranja, CN suplementado con DE. (A) Con extracto de brócoli diluido en metanol a 1 mg/mL. (B) Con extracto de brócoli diluido en metanol a 2,5 mg/mL. (C) Con extracto de brócoli concentrado en el DE a 1 mg/mL. (D) Con extracto de brócoli concentrado en el DE a 2,5 mg/mL.

6.3.1.2. Efecto del extracto de brócoli sobre el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680.

El extracto de brócoli tiene influencia sobre el crecimiento de *S. marcescens* 4680. Con el Ext1 en ambas concentraciones evaluadas (1 y 2,5 mg/mL) disminuye el valor de la DO, con respecto a los controles. En cambio, al suplementar el Ext2 en CN, los valores de DO del cultivo de *S. marcescens* 4680 aumentaron (tabla 9).

Tabla 9. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680.

Tiempo (h)	DO a una $\lambda = 600$ nm								
	Extracto de brócoli diluido en metanol					Extracto de brócoli concentrado			
	CCN	CME	Ext1	CME	Ext1	CDE	Ext2	CDE	Ext2
		1	1	2,5	2,5	1	1	2,5	2,5
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
0,5	0,015	0,005	0,000	0,052	0,000	0,000	0,225	0,000	0,268
1	0,111	0,020	0,000	0,040	0,000	0,000	0,307	0,005	0,413
2	0,237	0,239	0,030	0,030	0,020	0,184	0,569	0,104	0,648
3	0,516	0,658	0,230	0,185	0,147	0,424	1,247	0,224	1,352
4	0,958	1,293	0,678	0,458	0,453	1,118	1,833	0,679	2,124
5	1,482	1,550	1,270	0,940	1,040	1,478	1,834	1,262	2,528
6	1,644	1,607	1,650	1,314	1,494	1,689	1,993	1,263	2,258
7	1,748	1,700	1,745	1,387	1,604	1,902	2,096	1,410	2,490
24	5,359	4,763	4,370	3,791	4,234	4,658	4,584	3,915	3,703

h: horas, DO: Densidad óptica, CCN: Control de crecimiento de *S. marcescens* 4680 en CN, CME: Control de crecimiento de *S. marcescens* 4680 en CN suplementado con Metanol, CDE: Control de crecimiento de *S. marcescens* 4680 en CN suplementado con disolvente de extracción.

El Ext1 en ambas concentraciones (1 y 2,5 mg/mL) disminuye el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680 hasta las dos horas de cultivo, después la curva de crecimiento se sobrepone sobre las curvas de crecimiento control) (Figura 15A y 15B).

En la figura 15C y 15D, puede observarse que el crecimiento de *S. marcescens* 4680 en presencia del extracto concentrado resultó similar al crecimiento de los controles (en caldo nutritivo y en presencia del disolvente de extracción).

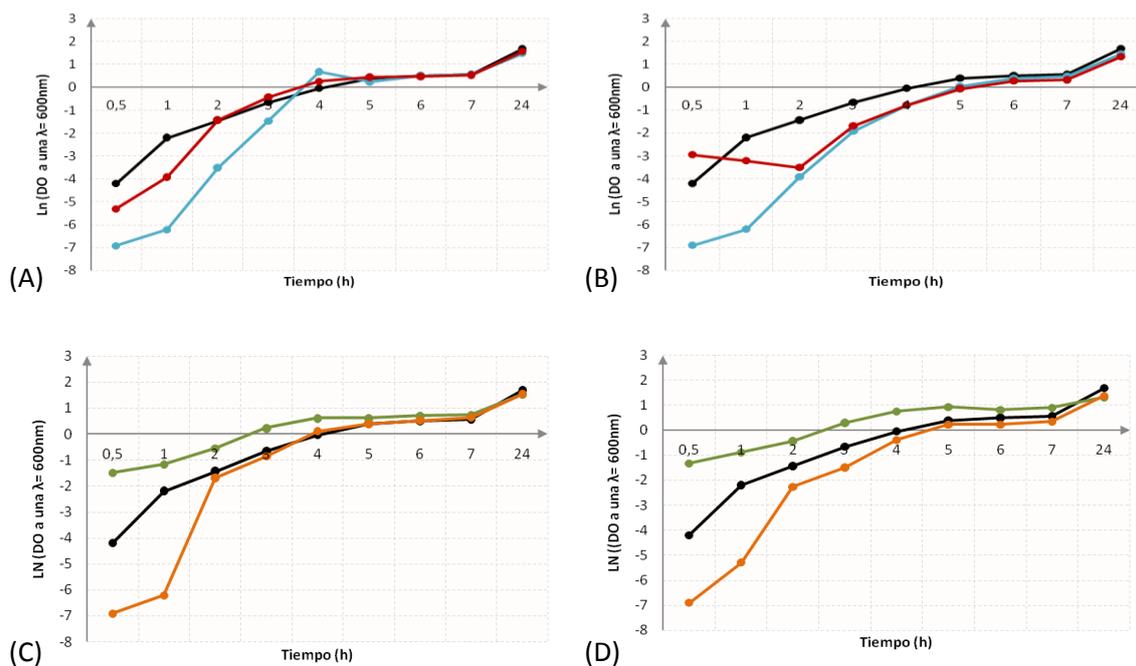


Figura15. Curvas de crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción. Curva negra, control CN sin suplementar de *A.baumannii* 5796. Curva roja, CN suplementado con metanol. Curva naranja, CN suplementado con DE. (A) Con extracto de brócoli diluido en metanol a 1 mg/mL. (B) Con extracto de brócoli diluido en metanol a 2,5 mg/mL. (C) Con extracto de brócoli concentrado en el DE a 1 mg/mL. (D) Con extracto de brócoli concentrado en el DE a 2,5 mg/mL.

6.3.2. Efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 en tubos de ensayo.

Se evaluó el efecto de los extractos de brócoli preparados (diluido y concentrado) y de las soluciones en las que se encuentran (metanol y disolvente de extracción); a dos concentraciones 1 y 2,5 mg/mL sobre el desarrollo de biopelículas de las cepas *A. baumannii* 5796 y de *S. marcescens* 4680 en tubos de ensayo. *A. baumannii* 5796 se evaluó a las 48 h de inoculación y *S. marcescens* 4680 se evaluó a las 72 h. Este ensayo se realizó por duplicado.

6.3.2.1. Efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 en tubos de ensayo.

Las biopelículas formadas por *A. baumannii* 5796, adheridas al tubo se clasificaron moderadas en presencia de ambos extractos, en ambas concentraciones evaluadas (1 y 2,5 mg/mL), tal como se observaron las biopelículas en el control en CN sin extracto de brócoli. Sin embargo, en presencia del metanol en CN, no hubo formación de biopelícula y en presencia del disolvente de extracción, hubo formación de biopelículas débiles. Se sugiere que el extracto de brócoli (diluido en ME y concentrado en el DE) contrarresta el efecto del metanol y el efecto del disolvente de extracción sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 en tubos de ensayo.

<i>Acinetobacter baumannii</i> 5796 (48 h, 37 °C)	Biopelícula adherida	<i>Acinetobacter baumannii</i> 5796 (48 h, 37 °C)	Biopelícula adherida
CCN	2	CCN	2
CME (1 mg/mL)	0	CDE (1 mg/mL)	1
Ext1 (1 mg/mL)	2	Ext2 (1 mg/mL)	2
CME (2,5 mg/mL)	1	CDE (2,5 mg/mL)	1
Ext1 (2,5 mg/mL)	2	Ext2 (2,5 mg/mL)	2

h: horas, CCN: Control CN sin suplementar, CME: Control CN suplementado con metanol, CDE: Control CN suplementado con DE, Ext1: Extracto de brócoli diluido en metanol, Ext2: Extracto de brócoli concentrado en DE. Biomasa de biopelícula adherida, (Hassan y col., 2011): 0- No formadora de biopelículas, 1- Formadora de biopelículas débiles, 2- Formadora de biopelículas moderadas, 3- Formadora de biopelículas fuertes.

6.3.2.2. Efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4680 en tubos de ensayo.

El Ext1 disminuye la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4680, pasando de ser clasificada como moderada (en control en CN sin extracto) a débil en su presencia; en cambio en presencia del Ext2, *S. marcescens* 4680 formó biopelículas moderadas, ambos con las dos concentraciones evaluadas, 1 y 2,5 mg/mL (Tabla 11). En presencia del metanol no hubo formación de biopelícula y en presencia del disolvente de extracción formó biopelícula débil. Se sugiere que el extracto de brócoli (diluido y concentrado) contrarresta el efecto del metanol y el efecto del disolvente de extracción sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4680.

Tabla 11. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol y del extracto de brócoli concentrado en el disolvente de extracción sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4680 en tubos de ensayo.

<i>Serratia marcescens</i> 4680 (72 h, 37°C)	Biopelícula adherida	<i>Serratia marcescens</i> 4680 (72 h, 37°C)	Biopelícula adherida
CCN	2	CCN	2
CME (1 mg/mL)	0	CDE (1 mg/mL)	1
Ext1 (1 mg/mL)	1	Ext2 (1 mg/mL)	2
CME (2,5 mg/mL)	1	CDE (2,5 mg/mL)	1
Ext1 (2,5 mg/mL)	1	Ext2 (2,5 mg/mL)	2

h: horas, CCN: Control CN sin suplementar, CME: Control CN suplementado con metanol, CDE: Control CN suplementado con DE, Ext1: Extracto de brócoli diluido en metanol, Ext2: Extracto de brócoli concentrado en DE. Biomasa de biopelícula adherida, (Hassan y col., 2011): 0- No formadora de biopelículas, 1- Formadora de biopelículas débiles, 2- Formadora de biopelículas moderadas, 3- Formadora de biopelículas fuertes.

Los resultados muestran que solo el Ext1 disminuye la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4680, pasando de ser clasificada como moderada a débil en las dos

concentraciones evaluadas, 1 y 2,5 mg/mL. El Ext1 no tiene efecto sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796, clasificándose como moderada (Tabla 11).

No hubo efecto del Ext2 sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y de *S. marcescens* 4680, en ninguna de las concentraciones evaluadas, 1 y 2,5 mg/mL clasificándose como moderada.

A partir de estos ensayos, se seleccionaron las condiciones para evaluar el efecto del extracto de brócoli en la síntesis de potenciales componentes de la matriz extracelular de biopelículas, mediante manifestación de morfotipo en ARC y en la formación de biopelículas sobre superficie de vidrio teñidas con CV, de las cepas *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680.

Para elegir la condición particular del extracto de brócoli a evaluar, se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

1. Afecta la formación de biopelícula de al menos una especie de estudio.
2. Afecta el crecimiento bacteriano de al menos una especie de estudio.

El extracto de brócoli concentrado en ninguna de las condiciones evaluadas afectó la formación de biopelícula de *A. baumannii* 5796 ni *S. marcescens* 4680. En cambio, el extracto de brócoli diluido afectó la formación de *S. marcescens* 4680 pasando de ser moderada en su ausencia a débil en la presencia de la misma, en ambas concentraciones.

Para seleccionar la concentración a utilizar, se basó en el segundo criterio ya que, la concentración de 2,5 mg/mL del Ext1 disminuyó el crecimiento de *A. baumannii* 5796.

6.3.3. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680.

Antes de evaluar el efecto del Ext1 2,5 mg/mL, sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 con las técnicas estandarizadas, se evaluó el efecto del Ext1 en el crecimiento bacteriano y la viabilidad celular por titulación en gota.

Para este ensayo se utilizó colina en solución acuosa al 50% (marca SIGMA), como control del efecto de grupos donadores de metilo.

6.3.3.1. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796.

En los ensayos preliminares de la sección 4.6, se obtuvo que los valores de DO disminuyeran, lo que implica que la densidad celular disminuye en presencia del Ext1 en 2,5 mg/mL. En cambio, al repetir la experiencia, se obtuvo que los valores de DO en presencia del Ext1 2,5 mg/mL, son similares a los valores de DO en su ausencia (tabla 12). Esto puede deberse a que el último extracto evaluado corresponde a un extracto diluido distinto al del ensayo preliminar (sección 4.6) por ende, la composición y efecto puede variar. Este ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 12. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el crecimiento bacteriano de *A.baumannii* 5796.

<i>Acinetobacter baumannii</i> 5796						
Tiempo (h)	CN no suplementado		Colina 2,5 mg/mL		Extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL	
	DO	Desvío estándar	DO	Desvío estándar	DO	Desvío estándar
2	0,328	0,095	0,248	0,070	0,469	0,027
4	0,508	0,062	0,309	0,055	0,583	0,065
6	0,658	0,095	0,353	0,037	0,737	0,034
24	6,737	2,013	0,415	0,083	6,303	1,092
48	9,447	2,592	0,466	0,115	8,437	1,462
72	12,480	0,458	0,503	0,098	9,798	2,405

h: horas, DO: Densidad óptica a una $\lambda= 600$ nm, CN: Caldo nutritivo.

En la figura 16 se observa que la fase exponencial de cada curva de crecimiento de *A. baumannii* 5796 en presencia y ausencia del Ext1 poseen pendientes similares. No se observan cambios en presencia de colina 2,5 mg/mL. En cambio, la curva de crecimiento de *A. baumannii* 5796 se redujo considerablemente con respecto a su crecimiento, cuando el medio estaba suplementado con Ext1 2,5mg/mL (figura 16).

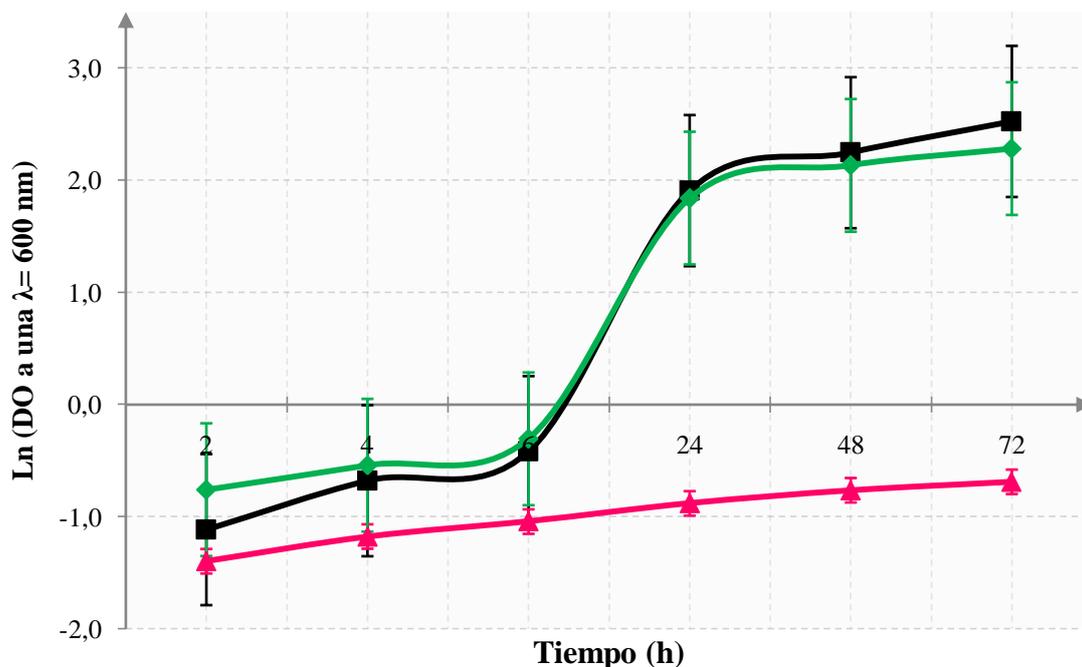


Figura16. Curva de crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL. Curva negra, crecimiento de *A. baumannii* 5796 en CN no suplementado. Curva rosa, crecimiento de *A. baumannii* 5796 en presencia de colina 2,5 mg/mL. Curva verde, crecimiento de *A. baumannii* 5796 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL

Los datos de crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL fueron analizados con un diseño de experimento unifactorial (ANOVA) en función del p-valor (probabilidad) resultante. El resultado se reporta en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados estadísticos para el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796.

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>0,07504156</td> <td>2</td> <td>0,03752078</td> <td>7,74209597</td> <td>0,021781946</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>0,029078</td> <td>6</td> <td>0,00484633</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>0,10411956</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	0,07504156	2	0,03752078	7,74209597	0,021781946	5,14325285	Dentro de los grupos	0,029078	6	0,00484633				Total	0,10411956	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-Valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,0748</td> <td>0,1403</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,0496</td> <td>0,0807</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0169</td> <td>0,2210</td> </tr> </tbody> </table> <p>Solo existe diferencia significativa entre Col-Ext1.</p>	Parejas	P-Valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,0748	0,1403	$\mu_1 = \mu_3$	0,0496	0,0807	$\mu_2 = \mu_3$	0,0169	0,2210	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	0,07504156	2	0,03752078	7,74209597	0,021781946	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	0,029078	6	0,00484633																																								
Total	0,10411956	8																																									
Parejas	P-Valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,0748	0,1403																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,0496	0,0807																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0169	0,2210																																									
4	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>0,120302</td> <td>2</td> <td>0,060151</td> <td>16,23801</td> <td>0,003792131</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>0,022226</td> <td>6</td> <td>0,00370433</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>0,142528</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	0,120302	2	0,060151	16,23801	0,003792131	5,14325285	Dentro de los grupos	0,022226	6	0,00370433				Total	0,142528	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-Valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,4134</td> <td>0,0750</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,0385</td> <td>0,1990</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0415</td> <td>0,2740</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-Valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,4134	0,0750	$\mu_1 = \mu_3$	0,0385	0,1990	$\mu_2 = \mu_3$	0,0415	0,2740	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	0,120302	2	0,060151	16,23801	0,003792131	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	0,022226	6	0,00370433																																								
Total	0,142528	8																																									
Parejas	P-Valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,4134	0,0750																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,0385	0,1990																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0415	0,2740																																									

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
6	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>0,24734022</td> <td>2</td> <td>0,12367011</td> <td>32,3405102</td> <td>0,00061171</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>0,022944</td> <td>6</td> <td>0,003824</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>0,27028422</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H0, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	0,24734022	2	0,12367011	32,3405102	0,00061171	5,14325285	Dentro de los grupos	0,022944	6	0,003824				Total	0,27028422	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-Valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,3686</td> <td>0,0797</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,0343</td> <td>0,3050</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0015</td> <td>0,3847</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-Valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,3686	0,0797	$\mu_1 = \mu_3$	0,0343	0,3050	$\mu_2 = \mu_3$	0,0015	0,3847	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	0,24734022	2	0,12367011	32,3405102	0,00061171	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	0,022944	6	0,003824																																								
Total	0,27028422	8																																									
Parejas	P-Valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,3686	0,0797																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,0343	0,3050																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0015	0,3847																																									
24	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>74,8318569</td> <td>2</td> <td>37,4159284</td> <td>21,3765118</td> <td>0,001864014</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>10,501974</td> <td>6</td> <td>1,750329</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>85,3338309</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H0, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	74,8318569	2	37,4159284	21,3765118	0,001864014	5,14325285	Dentro de los grupos	10,501974	6	1,750329				Total	85,3338309	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-Valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,8227</td> <td>0,4333</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,0307</td> <td>6,3220</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0113</td> <td>5,8887</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-Valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,8227	0,4333	$\mu_1 = \mu_3$	0,0307	6,3220	$\mu_2 = \mu_3$	0,0113	5,8887	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	74,8318569	2	37,4159284	21,3765118	0,001864014	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	10,501974	6	1,750329																																								
Total	85,3338309	8																																									
Parejas	P-Valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,8227	0,4333																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,0307	6,3220																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0113	5,8887																																									

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
48	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>145,1927</td> <td>2</td> <td>72,5963501</td> <td>24,5524173</td> <td>0,001290876</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>17,740742</td> <td>6</td> <td>2,95679033</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>162,933442</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	145,1927	2	72,5963501	24,5524173	0,001290876	5,14325285	Dentro de los grupos	17,740742	6	2,95679033				Total	162,933442	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-Valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,7072</td> <td>1,0100</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,0266</td> <td>8,9803</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0115</td> <td>7,9703</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-Valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,7072	1,0100	$\mu_1 = \mu_3$	0,0266	8,9803	$\mu_2 = \mu_3$	0,0115	7,9703	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	145,1927	2	72,5963501	24,5524173	0,001290876	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	17,740742	6	2,95679033																																								
Total	162,933442	8																																									
Parejas	P-Valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,7072	1,0100																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,0266	8,9803																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0115	7,9703																																									
72	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>237,057269</td> <td>2</td> <td>118,528634</td> <td>59,2476521</td> <td>0,000111942</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>12,0033753</td> <td>6</td> <td>2,00056256</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>249,060644</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	237,057269	2	118,528634	59,2476521	0,000111942	5,14325285	Dentro de los grupos	12,0033753	6	2,00056256				Total	249,060644	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-Valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,2080</td> <td>2,6817</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,0003</td> <td>11,9773</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>4,3027</td> <td>9,2957</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre la pareja de medias CN-Col.</p>	Parejas	P-Valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,2080	2,6817	$\mu_1 = \mu_3$	0,0003	11,9773	$\mu_2 = \mu_3$	4,3027	9,2957	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	237,057269	2	118,528634	59,2476521	0,000111942	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	12,0033753	6	2,00056256																																								
Total	249,060644	8																																									
Parejas	P-Valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,2080	2,6817																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,0003	11,9773																																									
$\mu_2 = \mu_3$	4,3027	9,2957																																									

Conclusión.

El extracto de brócoli 2,5 mg/mL no afecta el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796. A partir de las dos horas de inoculación del cultivo, la colina disminuye significativamente el crecimiento bacteriano de *A. baumannii* 5796.

6.3.3.2. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre la viabilidad celular por titulación en gota de *A. baumannii* 5796.

En cuanto al efecto del extracto de brócoli sobre la viabilidad celular, se obtuvo que el título bacteriano de *A. baumannii* 5796 resultó en el mismo orden de magnitud con respecto al control sin extracto (10^8) tal como se observa en la tabla 14. En el caso del control de CN suplementado con colina 2,5 mg/mL, el título bacteriano después de las 24 h disminuyó (10^4) hasta las 72 h, no se registró crecimiento de células viables por lo que su título fue igual a cero (tabla 14).

Tabla 14. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el título bacteriano de *A. baumannii* 5796.

Título (UFC/mL) de <i>A. baumannii</i> 5796			
Tiempo (h)	CCN	CColina 2,5 mg/mL	Extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL
2	$3,38 \times 10^7$	$1,34 \times 10^5$	$3,74 \times 10^7$
4	$5,84 \times 10^7$	$2,69 \times 10^5$	$4,18 \times 10^7$
6	$8,73 \times 10^7$	$1,96 \times 10^6$	$4,94 \times 10^7$
24	$1,54 \times 10^8$	$6,13 \times 10^6$	$1,33 \times 10^8$
48	$2,75 \times 10^8$	$5,00 \times 10^4$	$1,97 \times 10^8$
72	$5,09 \times 10^8$	0,00	$3,08 \times 10^8$

h: horas, UFC: Unidades formadoras de colonias, CCN: Control CN no suplementado, Ccolina: Control CN suplementado con colina.

La población bacteriana viable de *A. baumannii* 5796, en presencia del Ext1 2,5 mg/mL y colina 2,5 mg/mL hasta las 72 h de cultivo. El crecimiento de células viables de *A. baumannii* 5796 se reduce en presencia del extracto de brócoli 2,5 mg/mL, sin embargo, esta reducción es significativa en presencia de colina, donde conforme el tiempo, el crecimiento de células viables disminuyó hasta que no hubo crecimiento a las 72 h del cultivo, por lo que no se observa una curva tal como resultó en presencia y ausencia del Ext1 2,5 mg/mL.

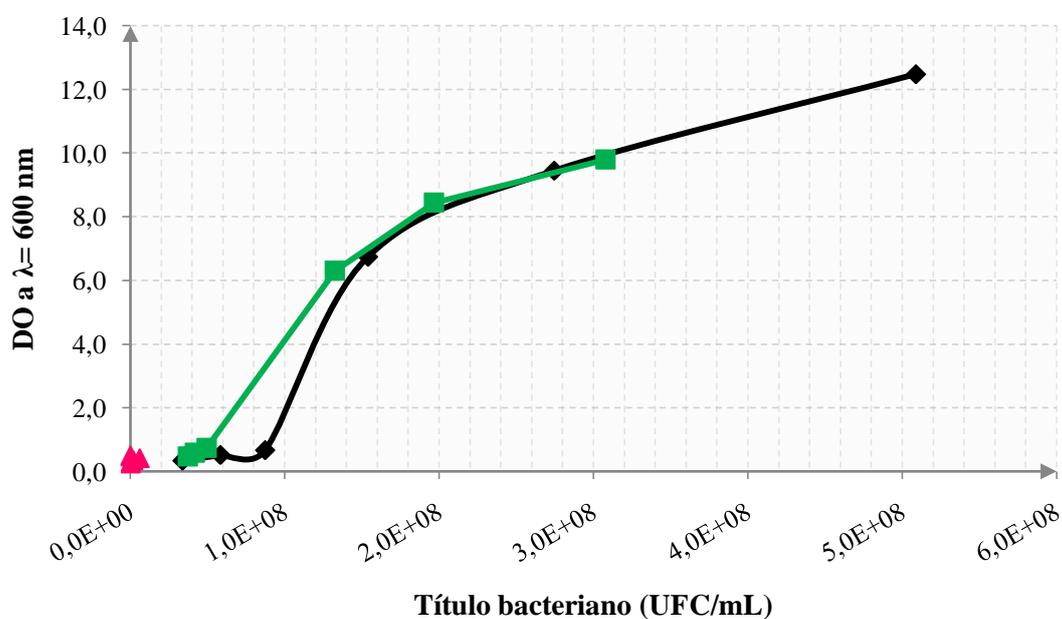


Figura 17. Título bacteriano de *A. baumannii* 5796 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL. Curva negra, crecimiento de *A. baumannii* 5796 en CN no suplementado. Curva rosa, crecimiento de *A. baumannii* 5796 en presencia de colina 2,5 mg/mL. Curva verde, crecimiento de *A. baumannii* 5796 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL.

Los datos del título bacteriano de *A. baumannii* 5796 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL fueron analizados con un diseño de experimento unifactorial (ANOVA) en función del p-valor (probabilidad) resultante. El resultado se reporta en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados estadísticos para el título bacteriano de *A. baumannii* 5796.

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																												
2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1,09759E+15</td> <td>2</td> <td>5,4879E+14</td> <td>3,88319877</td> <td>0,115566763</td> <td>6,94427191</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>5,653E+14</td> <td>4</td> <td>1,4133E+14</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1,66289E+15</td> <td>6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>No se tienen elementos suficientes para rechazar que exista al menos un tratamiento distinto entre ellos con un nivel de significación del 5%.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F	Entre grupos	1,09759E+15	2	5,4879E+14	3,88319877	0,115566763	6,94427191	Dentro de los grupos	5,653E+14	4	1,4133E+14				Total	1,66289E+15	6					-	No hay diferencias entre los tratamientos.
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F																								
Entre grupos	1,09759E+15	2	5,4879E+14	3,88319877	0,115566763	6,94427191																									
Dentro de los grupos	5,653E+14	4	1,4133E+14																												
Total	1,66289E+15	6																													
4	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>4,13388E+15</td> <td>2</td> <td>2,0669E+15</td> <td>3,92616925</td> <td>0,094399484</td> <td>5,78613504</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>2,63226E+15</td> <td>5</td> <td>5,2645E+14</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>6,76615E+15</td> <td>7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>No se tienen elementos suficientes para rechazar que exista al menos un tratamiento distinto entre ellos con un nivel de significación del 5%.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F	Entre grupos	4,13388E+15	2	2,0669E+15	3,92616925	0,094399484	5,78613504	Dentro de los grupos	2,63226E+15	5	5,2645E+14				Total	6,76615E+15	7					-	No hay diferencias entre los tratamientos.
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico para F																								
Entre grupos	4,13388E+15	2	2,0669E+15	3,92616925	0,094399484	5,78613504																									
Dentro de los grupos	2,63226E+15	5	5,2645E+14																												
Total	6,76615E+15	7																													

Tiempo
(h)

Tabla ANOVA

P-valor y LSD

Conclusión

6

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,09794E+16	2	5,4897E+15	23,4772764	0,001454601	5,14325285
Dentro de los grupos	1,40298E+15	6	2,3383E+14			
Total	1,23824E+16	8				

Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.

Parejas	P-Valor	LSD
$\mu_1 = \mu_2$	0,1617	37888888,8889
$\mu_1 = \mu_3$	0,0349	85375111,1111
$\mu_2 = \mu_3$	0,0068	47486222,2222

Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.

El extracto de brócoli no afecta el título bacteriano con respecto al control.

Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.

24

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,89202E+16	2	1,446E+16	99,8101149	9,33369E-05	5,786135043
Dentro de los grupos	7,24381E+14	5	1,4488E+14			
Total	2,96446E+16	7				

Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.

Parejas	P-Valor	LSD
$\mu_1 = \mu_2$	0,1028	21333333,3333
$\mu_1 = \mu_3$	0,0005	147871000,0000
$\mu_2 = \mu_3$	0,0016	126537666,6667

Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.

El extracto de brócoli no afecta el título bacteriano con respecto al control.

Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
48	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>9,23988E+16</td> <td>2</td> <td>4,6199E+16</td> <td>4,3398201</td> <td>0,080767813</td> <td>5,78613504</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>5,32273E+16</td> <td>5</td> <td>1,0645E+16</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1,45626E+17</td> <td>7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>No se tienen elementos suficientes para rechazar de que exista al menos un tratamiento distinto entre ellos con un nivel de significación del 5%.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	9,23988E+16	2	4,6199E+16	4,3398201	0,080767813	5,78613504	Dentro de los grupos	5,32273E+16	5	1,0645E+16				Total	1,45626E+17	7					-	No hay diferencias entre los tratamientos.												
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	9,23988E+16	2	4,6199E+16	4,3398201	0,080767813	5,78613504																																					
Dentro de los grupos	5,32273E+16	5	1,0645E+16																																								
Total	1,45626E+17	7																																									
72	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>3,94322E+17</td> <td>2</td> <td>1,9716E+17</td> <td>61,8912663</td> <td>9,88109E-05</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>1,91136E+16</td> <td>6</td> <td>3,1856E+15</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>4,13436E+17</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H0, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	3,94322E+17	2	1,9716E+17	61,8912663	9,88109E-05	5,14325285	Dentro de los grupos	1,91136E+16	6	3,1856E+15				Total	4,13436E+17	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-Valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,0173</td> <td>201111111,1111</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,0026</td> <td>509000000,0000</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0256</td> <td>307888888,8889</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Ext1, CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-Valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,0173	201111111,1111	$\mu_1 = \mu_3$	0,0026	509000000,0000	$\mu_2 = \mu_3$	0,0256	307888888,8889	<p>El extracto de brócoli afecta el título bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	3,94322E+17	2	1,9716E+17	61,8912663	9,88109E-05	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	1,91136E+16	6	3,1856E+15																																								
Total	4,13436E+17	8																																									
Parejas	P-Valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,0173	201111111,1111																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,0026	509000000,0000																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0256	307888888,8889																																									
<p>Conclusión.</p> <p>A las 2 y 4 h, no existe diferencia entre los tratamientos. A partir de las seis horas de inoculación del cultivo, la colina disminuye significativamente la viabilidad celular de <i>A. baumannii</i> 5796. Solo a las 72 horas de cultivo, el extracto de brócoli 2,5 mg/mL disminuye la viabilidad celular de <i>A. baumannii</i> 5796.</p>																																											

6.3.3.3. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680.

El crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL y en presencia de la colina 2,5 mg/mL disminuye según los valores de DO reportados en la tabla 16. Este ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 16. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680.

<i>Serratia marcescens</i> 4680						
Tiempo (h)	CN no suplementado		Colina 2,5 mg/mL		Ext1 2,5 mg/mL	
	DO	Desvío estándar	DO	Desvío estándar	DO	Desvío estándar
2	0,372	0,095	0,174	0,022	0,280	0,266
4	1,953	0,513	0,200	0,019	0,354	0,084
6	3,318	1,215	0,231	0,004	0,771	0,240
24	3,857	1,148	0,261	0,027	2,953	0,223
48	4,607	0,776	0,312	0,074	4,245	0,876
72	5,365	1,517	0,363	0,067	4,803	1,011

h: horas, DO: Densidad óptica a una $\lambda= 600$ nm, CN: Caldo nutritivo.

En la figura 18 puede notarse que en el control sin extracto hay un alcance de la fase estacionaria cerca de las 6 h. En cambio, en presencia del Ext1 2,5 mg/mL, el crecimiento de *S. marcescens* 4680 disminuye y la fase estacionaria se alcanza a las 24 h.

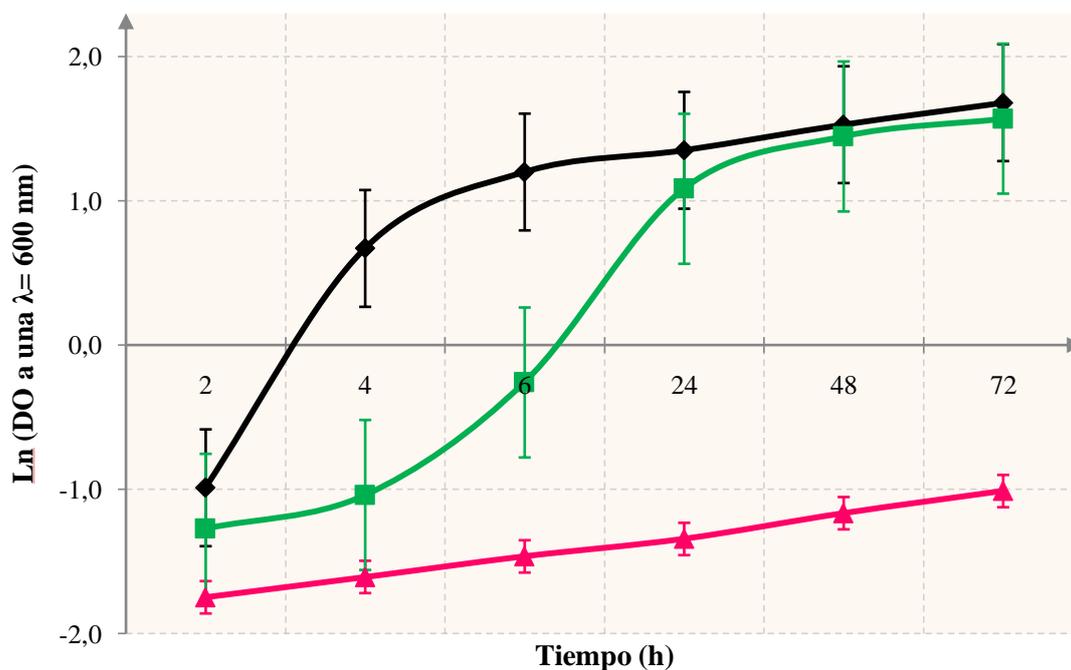


Figura18. Curva de crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL. Curva negra, crecimiento de *S. marcescens* 4680 en CN no suplementado. Curva rosa, crecimiento de *S. marcescens* 4680 en presencia de colina 2,5 mg/mL. Curva verde, crecimiento de *S. marcescens* 4680 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL

Los datos de crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL fueron analizados con un diseño de experimento unifactorial (ANOVA) en función del p-valor (probabilidad) resultante. El resultado se reporta en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados estadísticos para el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* 4680.

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>0,05870156</td> <td>2</td> <td>0,02935078</td> <td>1,09427092</td> <td>0,393399709</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>0,16093333</td> <td>6</td> <td>0,02682222</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>0,21963489</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	0,05870156	2	0,02935078	1,09427092	0,393399709	5,14325285	Dentro de los grupos	0,16093333	6	0,02682222				Total	0,21963489	8					-	No hay diferencias entre los tratamientos.												
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																				
	Entre grupos	0,05870156	2	0,02935078	1,09427092	0,393399709	5,14325285																																				
	Dentro de los grupos	0,16093333	6	0,02682222																																							
Total	0,21963489	8																																									
No se tienen elementos suficientes para rechazar que exista al menos un tratamiento distinto entre ellos con un nivel de significación del 5%.																																											
4	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>5,65545356</td> <td>2</td> <td>2,82772678</td> <td>31,4003462</td> <td>0,000663247</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>0,540324</td> <td>6</td> <td>0,090054</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>6,19577756</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	5,65545356	2	2,82772678	31,4003462	0,000663247	5,14325285	Dentro de los grupos	0,540324	6	0,090054				Total	6,19577756	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,03981299</td> <td>1,59966667</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,02888169</td> <td>1,753</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,05662012</td> <td>0,15333333</td> </tr> </tbody> </table>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,03981299	1,59966667	$\mu_1 = \mu_3$	0,02888169	1,753	$\mu_2 = \mu_3$	0,05662012	0,15333333	<p>El extracto de brócoli afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																				
	Entre grupos	5,65545356	2	2,82772678	31,4003462	0,000663247	5,14325285																																				
	Dentro de los grupos	0,540324	6	0,090054																																							
Total	6,19577756	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,03981299	1,59966667																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,02888169	1,753																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,05662012	0,15333333																																									
Se rechaza la H ₀ , ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.		Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Ext1 y CN-Col.																																									

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
6	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>16,31079622</td> <td>2</td> <td>8,155398111</td> <td>15,9551593</td> <td>0,003964436</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>3,066869333</td> <td>6</td> <td>0,511144889</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>19,37766556</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	16,31079622	2	8,155398111	15,9551593	0,003964436	5,14325285	Dentro de los grupos	3,066869333	6	0,511144889				Total	19,37766556	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,052948699</td> <td>2,547</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,048177633</td> <td>3,087333333</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,061759619</td> <td>0,540333333</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe solo diferencia significativa entre la pareja de medias CN-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,052948699	2,547	$\mu_1 = \mu_3$	0,048177633	3,087333333	$\mu_2 = \mu_3$	0,061759619	0,540333333	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	16,31079622	2	8,155398111	15,9551593	0,003964436	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	3,066869333	6	0,511144889																																								
Total	19,37766556	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,052948699	2,547																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,048177633	3,087333333																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,061759619	0,540333333																																									
24	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>20,9976809</td> <td>2</td> <td>10,4988404</td> <td>22,9988407</td> <td>0,001536391</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>2,738966</td> <td>6</td> <td>0,45649433</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>23,7366469</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	20,9976809	2	10,4988404	22,9988407	0,001536391	5,14325285	Dentro de los grupos	2,738966	6	0,45649433				Total	23,7366469	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,37197051</td> <td>0,903333333</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,03353322</td> <td>3,596</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0019078</td> <td>2,69266667</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,37197051	0,903333333	$\mu_1 = \mu_3$	0,03353322	3,596	$\mu_2 = \mu_3$	0,0019078	2,69266667	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	20,9976809	2	10,4988404	22,9988407	0,001536391	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	2,738966	6	0,45649433																																								
Total	23,7366469	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,37197051	0,903333333																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,03353322	3,596																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0019078	2,69266667																																									

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
48	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>34,0489389</td> <td>2</td> <td>17,0244694</td> <td>37,1409565</td> <td>0,000417446</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>2,75024733</td> <td>6</td> <td>0,45837456</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>36,7991862</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	34,0489389	2	17,0244694	37,1409565	0,000417446	5,14325285	Dentro de los grupos	2,75024733	6	0,45837456				Total	36,7991862	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,70055005</td> <td>0,36166667</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,00883917</td> <td>4,295</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,01791041</td> <td>3,93333333</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,70055005	0,36166667	$\mu_1 = \mu_3$	0,00883917	4,295	$\mu_2 = \mu_3$	0,01791041	3,93333333	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																				
	Entre grupos	34,0489389	2	17,0244694	37,1409565	0,000417446	5,14325285																																				
	Dentro de los grupos	2,75024733	6	0,45837456																																							
Total	36,7991862	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,70055005	0,36166667																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,00883917	4,295																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,01791041	3,93333333																																									
72	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>45,0457389</td> <td>2</td> <td>22,5228694</td> <td>20,292399</td> <td>0,00213659</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>6,65949933</td> <td>6</td> <td>1,10991656</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>51,7052382</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	45,0457389	2	22,5228694	20,292399	0,00213659	5,14325285	Dentro de los grupos	6,65949933	6	1,10991656				Total	51,7052382	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,6859153</td> <td>0,56166667</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,02751953</td> <td>5,00166667</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,01879979</td> <td>4,44</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,6859153	0,56166667	$\mu_1 = \mu_3$	0,02751953	5,00166667	$\mu_2 = \mu_3$	0,01879979	4,44	<p>El extracto de brócoli no afecta el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el crecimiento bacteriano con respecto al control.</p>
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																				
	Entre grupos	45,0457389	2	22,5228694	20,292399	0,00213659	5,14325285																																				
	Dentro de los grupos	6,65949933	6	1,10991656																																							
Total	51,7052382	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,6859153	0,56166667																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,02751953	5,00166667																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,01879979	4,44																																									
<p>Conclusión.</p> <p>A las 2 h de cultivo no hay diferencia entre los tratamientos. El extracto de brócoli 2,5 mg/mL disminuye el crecimiento bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680 a las dos horas de inoculación. A partir de las cuatro horas de inoculación del cultivo, la colina disminuye significativamente el crecimiento bacteriano de <i>S. marcescens</i> 4680.</p>																																											

6.3.3.4. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre la viabilidad celular por titulación en gota de *S. marcescens* 4680.

El título bacteriano de *S. marcescens* 4680 a las dos horas de inoculación resultó en un orden de magnitud inferior (10^6) respecto al control (10^7), hasta después de las 4 h resultó en el mismo orden de magnitud que el título bacteriano del control sin extracto (Tabla 18).

En la tabla 18 también puede notarse que, en presencia de colina hasta las 72 h, disminuye el título la viabilidad celular de *S. marcescens* 4680 tres órdenes de magnitud (10^6), con respecto a la viabilidad celular del control sin extracto de brócoli (10^9); lo que significa que colina disminuye considerablemente la viabilidad celular de *S. marcescens* 4680 con respecto al extracto de brócoli.

Tabla 18. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre el título bacteriano de *S. marcescens* 4680.

Título (UFC/mL) de <i>Serratia marcescens</i> 4680			
Tiempo (h)	CN no suplementado	Colina 2,5 mg/mL	Ext1 2,5 mg/mL
2	$1,03 \times 10^7$	$6,33 \times 10^4$	$5,50 \times 10^6$
4	$3,00 \times 10^7$	$1,17 \times 10^5$	$1,59 \times 10^7$
6	$1,97 \times 10^8$	$1,39 \times 10^5$	$1,18 \times 10^8$
24	$3,31 \times 10^8$	$1,49 \times 10^5$	$2,08 \times 10^8$
48	$4,80 \times 10^8$	$4,87 \times 10^6$	$2,16 \times 10^8$
72	$2,50 \times 10^9$	$4,84 \times 10^6$	$3,52 \times 10^8$

h: horas, UFC: Unidades formadoras de colonias, CN: Caldo nutritivo.

En la figura 19 puede observarse la magnitud de la población total bacteriana viva de *S. marcescens* 4680 en presencia del extracto de brócoli y colina (ambos 2,5mg/mL) hasta las 72 h de cultivo. El crecimiento de células viables de *S. marcescens* 4680 se reduce en presencia del Ext1 2,5 mg/mL, en cambio, en presencia de colina 2,5 mg/mL, la tasa de crecimiento de células viables fue muy baja hasta las 72 h del cultivo, por lo que no se observa una curva tal como resultó en presencia y ausencia del Ext1 2,5 mg/mL.

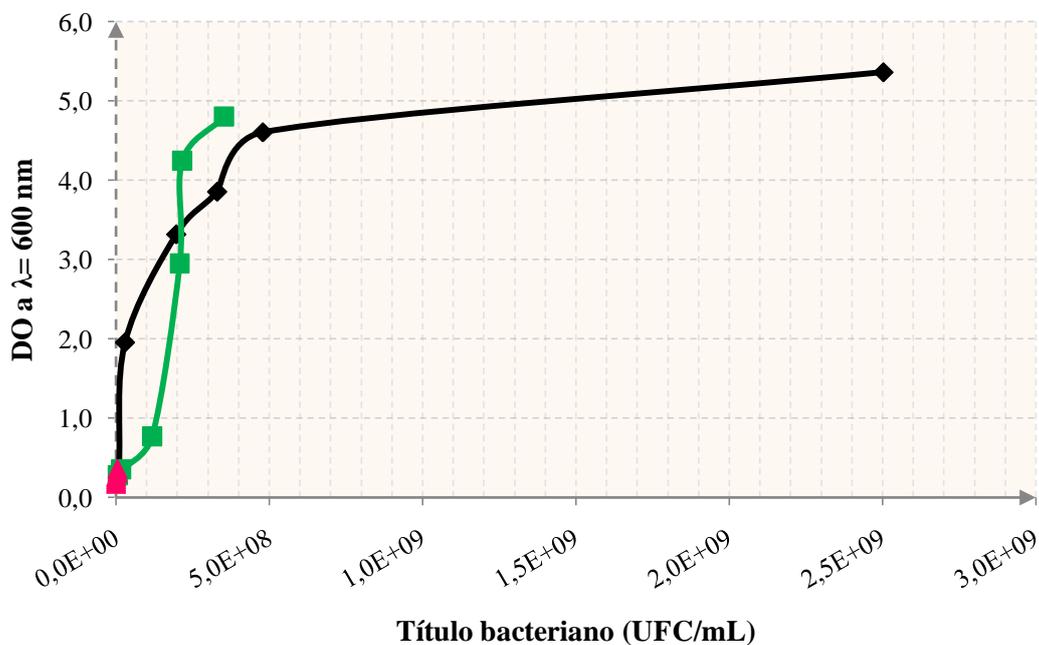


Figura19. Título bacteriano de *S. marcescens* 4680 en presencia del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL. Curva negra, título bacteriano de *S. marcescens* 4680 en CN no suplementado. Curva rosa, título bacteriano de *S. marcescens* 4680 en CN suplementado con colina 2,5 mg/mL (curva rosa). Curva verde, título bacteriano de *S. marcescens* 4680 en CN suplementado con Ext1 2,5 mg/mL

Los datos del título bacteriano de *S. marcescens* 4680 en presencia del Ext1 2,5 mg/mL fueron analizados con un diseño de experimento unifactorial (ANOVA) en función del p-valor (probabilidad) resultante. El resultado se reporta en la tabla 19.

Tabla 19. Resultados estadísticos para el título bacteriano de *S. marcescens* 4680.

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
2	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1,5839E+14</td> <td>2</td> <td>7,9196E+13</td> <td>284,92209</td> <td>1,1312E-06</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>1,6677E+12</td> <td>6</td> <td>2,7796E+11</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1,6006E+14</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	1,5839E+14	2	7,9196E+13	284,92209	1,1312E-06	5,14325285	Dentro de los grupos	1,6677E+12	6	2,7796E+11				Total	1,6006E+14	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,01510836</td> <td>4833333,33</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,00030705</td> <td>10270000</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,00813817</td> <td>5436666,67</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Ext1, CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,01510836	4833333,33	$\mu_1 = \mu_3$	0,00030705	10270000	$\mu_2 = \mu_3$	0,00813817	5436666,67	<p>El extracto de brócoli afecta el título bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	1,5839E+14	2	7,9196E+13	284,92209	1,1312E-06	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	1,6677E+12	6	2,7796E+11																																								
Total	1,6006E+14	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,01510836	4833333,33																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,00030705	10270000																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,00813817	5436666,67																																									
4	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1,2335E+15</td> <td>2</td> <td>6,1674E+14</td> <td>102,729555</td> <td>2,28441E-05</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>3,6021E+13</td> <td>6</td> <td>6,0035E+12</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1,2695E+15</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	1,2335E+15	2	6,1674E+14	102,729555	2,28441E-05	5,14325285	Dentro de los grupos	3,6021E+13	6	6,0035E+12				Total	1,2695E+15	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,02831906</td> <td>14111111,1</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,00533359</td> <td>29927222,2</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,01736434</td> <td>15816111,1</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Ext1, CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,02831906	14111111,1	$\mu_1 = \mu_3$	0,00533359	29927222,2	$\mu_2 = \mu_3$	0,01736434	15816111,1	<p>El extracto de brócoli afecta el título bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	1,2335E+15	2	6,1674E+14	102,729555	2,28441E-05	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	3,6021E+13	6	6,0035E+12																																								
Total	1,2695E+15	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,02831906	14111111,1																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,00533359	29927222,2																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,01736434	15816111,1																																									

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
6	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>5,9075E+16</td> <td>2</td> <td>2,9538E+16</td> <td>33,2144423</td> <td>0,000568484</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>5,3358E+15</td> <td>6</td> <td>8,893E+14</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>6,4411E+16</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	5,9075E+16	2	2,9538E+16	33,2144423	0,000568484	5,14325285	Dentro de los grupos	5,3358E+15	6	8,893E+14				Total	6,4411E+16	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,13642347</td> <td>79266666,7</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,02089824</td> <td>197193889</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,00353362</td> <td>117927222</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Col y Ext1-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,13642347	79266666,7	$\mu_1 = \mu_3$	0,02089824	197193889	$\mu_2 = \mu_3$	0,00353362	117927222	<p>El extracto de brócoli no afecta el título bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	5,9075E+16	2	2,9538E+16	33,2144423	0,000568484	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	5,3358E+15	6	8,893E+14																																								
Total	6,4411E+16	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,13642347	79266666,7																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,02089824	197193889																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,00353362	117927222																																									

24	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1,6747E+17</td> <td>2</td> <td>8,3734E+16</td> <td>23,574292</td> <td>0,001438728</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>2,1312E+16</td> <td>6</td> <td>3,5519E+15</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1,8878E+17</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	1,6747E+17	2	8,3734E+16	23,574292	0,001438728	5,14325285	Dentro de los grupos	2,1312E+16	6	3,5519E+15				Total	1,8878E+17	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,22424685</td> <td>122800000</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,00153337</td> <td>330517778</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,0702717</td> <td>207717778</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre la pareja de medias CN-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,22424685	122800000	$\mu_1 = \mu_3$	0,00153337	330517778	$\mu_2 = \mu_3$	0,0702717	207717778	<p>El extracto de brócoli no afecta el título bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	1,6747E+17	2	8,3734E+16	23,574292	0,001438728	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	2,1312E+16	6	3,5519E+15																																								
Total	1,8878E+17	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,22424685	122800000																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,00153337	330517778																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,0702717	207717778																																									

Tiempo (h)	Tabla ANOVA	P-valor y LSD	Conclusión																																								
48	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>3,394E+17</td> <td>2</td> <td>1,697E+17</td> <td>50,698097</td> <td>0,000174376</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>2,0084E+16</td> <td>6</td> <td>3,3473E+15</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>3,5949E+17</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Se rechaza la H₀, ya que existe al menos un tratamiento que genera diferencia.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	3,394E+17	2	1,697E+17	50,698097	0,000174376	5,14325285	Dentro de los grupos	2,0084E+16	6	3,3473E+15				Total	3,5949E+17	8					<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parejas</th> <th>P-valor</th> <th>LSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_2$</td> <td>0,04103119</td> <td>263583333</td> </tr> <tr> <td>$\mu_1 = \mu_3$</td> <td>0,00026206</td> <td>474711333</td> </tr> <tr> <td>$\mu_2 = \mu_3$</td> <td>0,07529302</td> <td>211128000</td> </tr> </tbody> </table> <p>Existe diferencia significativa entre las parejas de medias CN-Ext1 y CN-Col.</p>	Parejas	P-valor	LSD	$\mu_1 = \mu_2$	0,04103119	263583333	$\mu_1 = \mu_3$	0,00026206	474711333	$\mu_2 = \mu_3$	0,07529302	211128000	<p>El extracto de brócoli afecta el título bacteriano con respecto al control.</p> <p>Colina afecta significativamente el título bacteriano con respecto al control.</p>
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	3,394E+17	2	1,697E+17	50,698097	0,000174376	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	2,0084E+16	6	3,3473E+15																																								
Total	3,5949E+17	8																																									
Parejas	P-valor	LSD																																									
$\mu_1 = \mu_2$	0,04103119	263583333																																									
$\mu_1 = \mu_3$	0,00026206	474711333																																									
$\mu_2 = \mu_3$	0,07529302	211128000																																									
72	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1,0988E+19</td> <td>2</td> <td>5,4938E+18</td> <td>4,06084169</td> <td>0,076699819</td> <td>5,14325285</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>8,1172E+18</td> <td>6</td> <td>1,3529E+18</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1,9105E+19</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>No se tienen elementos suficientes para rechazar que exista al menos un tratamiento distinto entre ellos con un nivel de significancia del 5%.</p>	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	1,0988E+19	2	5,4938E+18	4,06084169	0,076699819	5,14325285	Dentro de los grupos	8,1172E+18	6	1,3529E+18				Total	1,9105E+19	8					-	No hay diferencias entre los tratamientos.												
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																																					
Entre grupos	1,0988E+19	2	5,4938E+18	4,06084169	0,076699819	5,14325285																																					
Dentro de los grupos	8,1172E+18	6	1,3529E+18																																								
Total	1,9105E+19	8																																									
<p>Conclusión.</p> <p>El extracto de brócoli 2,5 mg/mL disminuye la viabilidad celular de <i>S. marcescens</i> 4680 a las dos, cuatro y 48 horas de inoculación del cultivo. A partir de las dos horas de inoculación del cultivo hasta las 48 h, la colina disminuye significativamente la viabilidad celular de <i>S. marcescens</i> 4680.</p>																																											

6.3.3.5. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 en tubos de ensayo.

El Ext1 2,5 mg/mL no afectó la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796, observándose moderadas, tal como el control en CN sin suplementar con Ext1 2,5 mg/mL. Sin embargo, si afectó la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4680 adherida al tubo, pasando de moderadas en CN sin suplementar con Ext1 2,5 mg/mL a débil en presencia del Ext1 2,5 mg/mL a las 72 h de inoculación.

Para ambas cepas *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680, en presencia de colina 2,5 mg/mL no se formaron biopelículas (Tabla 20). Este ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 20. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL sobre la formación de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680.

	Clasificación de biopelículas	
	<i>A. baumannii</i> 5796 (48 h, 37 °C)	<i>S. marcescens</i> 4680 (72 h, 37 °C)
CN sin suplementar	2	2
Colina 2,5 mg/mL	0	0
Ext1 2,5 mg/mL	2	1

6.3.3.6. Efecto del extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL en la formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 sobre agar rojo congo.

Se evaluó la síntesis de los potenciales componentes de la matriz extracelular en biopelículas, distinguiendo morfotipo de cepas en agar RC 0,004 %(m/v) suplementado con AC 0,001 %(m/v), a 37 °C por 24 h de incubación. Este ensayo se realizó por triplicado.

Las cepas, *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 en ARC suplementado con Ext1 2,5 mg/mL no presentaron cambios, evidenciándose morfologías de colonias similares respecto al control ARC sin suplementar con Ext1 2,5 mg/mL (Tabla 21).

Tabla 21. Características morfológicas de las colonias de las cepas bacterianas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680, crecidas sobre agar rojo congo suplementado con extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL.

Características morfológicas evaluadas	<i>A. baumannii</i> 5796			<i>S. marcescens</i> 4680		
	Composición del agar			Composición del agar		
	ARC	ARC + Colina	ARC + Ext1	ARC	ARC + Colina	ARC + Ext1
Borde	Estriado	Definido	Estriado	Definido	Definido	Definido
Textura	Rugosa	Lisa	Rugosa	Rugosa	Lisa	Rugosa
Color	Blanco	Incoloro	Blanco	Rosado	Incoloro	Rosado

ARC. Agar rojo congo; Ext1. Extracto de brócoli diluido en metanol.

Las colonias crecidas sobre ARC de *A. baumannii* 5796 se manifestaron color blanco; en cambio, las colonias de *S. marcescens* 4680 se observaron color rosado, tal como se presenta en la figura 20.

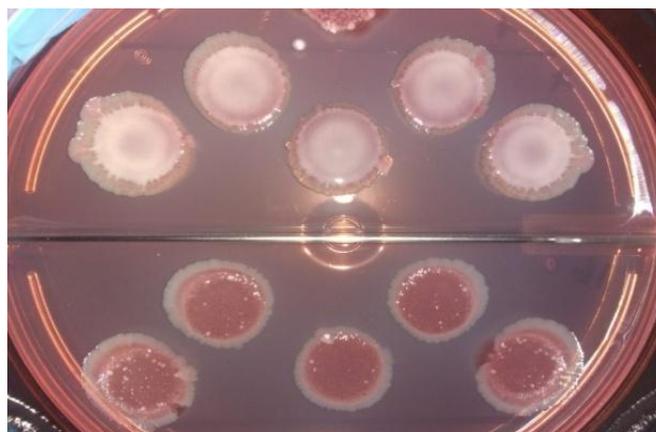


Figura 20. Morfología de las colonias de las cepas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 destacando color de las colonias crecidas sobre ARC, 72 h de incubación, 37 °C.

Panel superior. Réplicas de la cepa de *A. baumannii* 5796. Panel inferior. Réplicas de la cepa de *S. marcescens* 4680.

La morfología de las colonias de las cepas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 en ARC suplementado con colina 2,5 mg/mL (Figura 21B) difiere a la morfología de las mismas en ARC sin suplementar con colina 2,5 mg/mL (Figura 21A),

quiere decir que la colina afecta la síntesis de los potenciales componentes de la matriz extracelular. Las colonias se observan incoloras, ya que no hay fijación del colorante.

En cambio, en ARC suplementado con Ext1 2,5 mg/mL (Figura 21C) las características de las morfologías de las cepas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680 fueron las mismas observadas en ARC sin suplementar con Ext1 2,5 mg/mL (figura 21A), lo que significa que el extracto de brócoli no afecta la síntesis de los potenciales componentes de la matriz extracelular en biopelículas (Figura 21C).

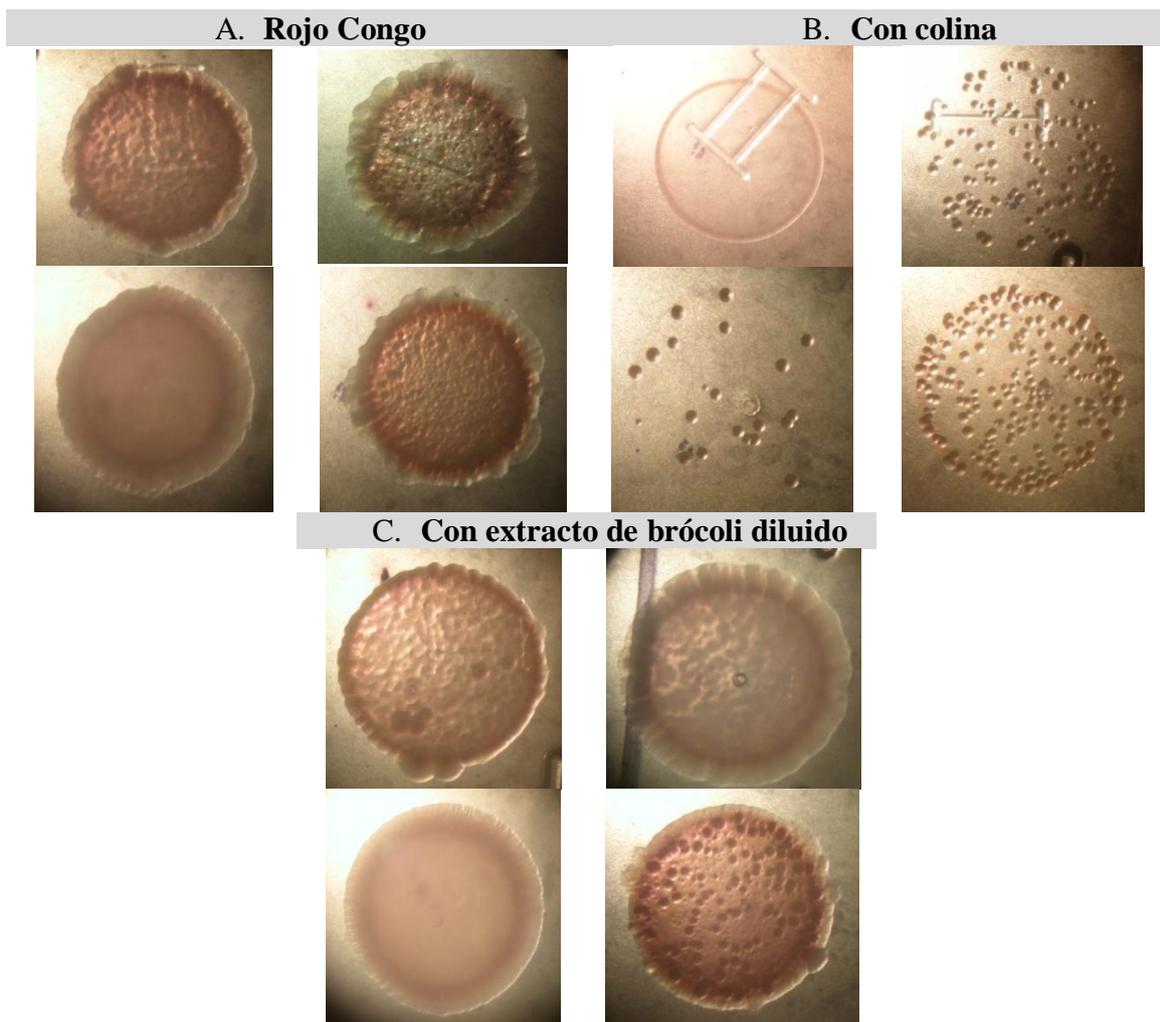


Figura21. Morfologías de las colonias de las cepas de *A. baumannii* 5796 y de *S. marcescens* 4680 en tres medios: Rojo congo, rojo congo suplementado con colina 2,5 mg/mL y rojo congo suplementado con extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL. Panel superior. Izq. control positivo *Salmonella entérica*. Derecha. Control negativo *E. coli* HB101. Panel inferior, Izq. *A. baumannii* 5796. Derecha. *S. marcescens* 4680. Lupa Nikontype 104, 200

7. DISCUSIÓN

Las especies de estudio utilizadas en la presente investigación fueron *S. marcescens* y *A. baumannii*, provenientes de aislados clínicos. La especie *S. marcescens* es habitante ubicuo del suelo, el agua y la superficie de las plantas. Además, se ha descrito como factor etiológico poco frecuente de infecciones adquiridas en la comunidad y está emergiendo como un patógeno oportunista de brotes nosocomiales (Carrillo, 2015). La especie *A. baumannii* predomina en el ámbito hospitalario, siendo causante de infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos y destaca por su notable capacidad en adquirir determinantes de resistencia (Lee y col., 2006).

Ambas especies, *S. marcescens* y *A. baumannii* forman biopelículas. El agar RC representa un método indirecto para evaluar formación de biopelículas bacterianas. Se ha descrito que el agar rojo congo permite detectar la capacidad de secreción de fibras amiloides tipo curli y celulosa, mediante la manifestación de morfotipos en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Zhou y col., 2013). Las colonias rosadas-rojas son cepas productoras de fibras curli tipo amiloide; mientras que las cepas incoloras o blanquecinas, no lo son (Martinez y col., 2008).

No hay reportes previos de ensayos estandarizados del método agar rojo congo en *Acinetobacter baumannii* ni en *Serratia marcescens*. Se sugiere que las cepas N° 6596, 2317, 7528 y 5796 de *A. baumannii*, cuyas colonias se observaron blancas, secretan otros componentes proteicos y polisacáridos como potenciales formadores de las sustancias poliméricas extracelulares, distintos a las fibras de tipo curli y celulosa (Martinez y col., 2008).

La composición de la matriz extracelular es heterogénea (Flemming y col., 2016), está constituida de diversas proteínas, exopolisacáridos, lípidos y ADN extracelular (eDNA) que desempeñan un papel crítico en la formación de biopelículas.

La formación de la matriz extracelular es un proceso dinámico que depende de las condiciones del entorno, por ejemplo, por disponibilidad de nutrientes y otras moléculas, que luego se pueden retener tanto por sorción a moléculas de sustancias poliméricas extracelulares, como a los poros y canales de la matriz (Flemming y col., 2016).

Otro método para evaluar formación de biopelículas es en tubos de ensayo mediante su visualización con CV. Las cepas de *S. marcescens* 7172 y 3018 no formaron biopelículas en tubos de ensayo a las 96 h de incubación. Los autores Rice y colaboradores (2005) explican que la formación de biopelículas de *Serratia marcescens* es un proceso dinámico que responde a las condiciones de nutrientes, determinando que las biopelículas formadas por *S. marcescens* se desprenden constantemente del sustrato después de aproximadamente 75 a 80 h de desarrollo, lo que pudiera ser la razón por la que no se observó biopelícula para esas dos cepas de estudio. Se sugiere que pudiese estar ocurriendo también con las cepas de *A. baumannii*, en la que la biopelícula formada se desprende a partir de las 48 h de incubación.

El método de detección de formación de biopelículas con CV en tubos de ensayo permite identificar las cepas bacterianas productoras de biopelículas fuertes, pero es difícil diferenciar entre productores moderados, débiles y no formadores de biopelículas. Esta clasificación va a depender del criterio del observador (Hassan y col., 2011).

Ambos métodos evaluados en este trabajo, la formación de biopelículas sobre ARC y el método de detección de formación de biopelículas con CV en tubos de ensayo, corresponden a ensayos de formación de biopelículas en un sistema cerrado y estático. Se tiene en cuenta que en el primer método, la biomasa formada corresponde a células vivas; en cambio, para el segundo método no se puede distinguir entre

poblaciones bacterianas vivas y muertas, por la unión no específica que tiene el CV a proteínas aniónicas y otras moléculas cargadas negativamente, como cápsulas, lipopolisacáridos y ADN / ácidos nucleicos (Haney y col., 2018).

No obstante, el segundo método es muy útil ya que se une directamente a la biomasa de la biopelícula aparente formada por el cultivo y permite su visualización, tal como se ha utilizado para describir bacterias Gram positivas y Gram negativas con la capacidad de formar biopelículas, como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonasaeruginosa* (Hassan y col., 2011).

Otra superficie de vidrio evaluada fueron las varillas de vidrio. Se ha descrito que la adhesión bacteriana es favorecida sobre superficies ásperas e hidrofóbicas y la colonización microbiana incrementa a medida que aumenta el área y la aspereza de la superficie (Thomas, 2006). Las varillas de vidrio tienen un área de superficie reducida y carecen de dicha aspereza, por la que en ambas especies no se distingue un patrón de formación de biopelículas.

Luego de estandarizar las técnicas de ARC y formación de biopelículas sobre superficie de vidrio teñido con CV en *A. baumannii* y *S. marcescens* se procedió a evaluar el efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas de *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens*

Este estudio representa el primer aporte a nivel nacional que evalúa el efecto de extractos de brócoli en cepas de importancia clínica. Los resultados demuestran que existe influencia del extracto de brócoli, no sólo sobre el formato de vida planctónico, sino también sobre el desarrollo de biopelículas de ambas especies de estudio en condiciones de crecimiento específicas.

Se conoce que el contenido de compuestos bioactivos en brócoli varía con el genotipo, estrés ambiental, condiciones de crecimiento, almacenamiento y procesamiento de alimentos. En el brócoli, no sólo hay moléculas de colina, también es una fuente rica de fitoquímicos (glucosinolatos y compuestos fenólicos) y micronutrientes como la vitamina C y minerales (Perez y col., 2008).

Los extractos de brócoli evaluados en este trabajo son derivados de alimento, ricos en colina y compuestos relacionados según el protocolo de Xiong, 2012. La concentración de colina en un extracto de brócoli determinado es variable y para este estudio se desconoce la concentración exacta de colina en cada concentración evaluada de los extractos preparados, diluido en metanol y concentrado en el disolvente de extracción.

La colina es un compuesto donador de metilo (Donkin, 2011). La metilación del ADN es responsable de la expresión génica (Wolffe, 1999). En este proyecto se sugiere que al suplementar en los medios de cultivo ensayados, colina y extracto de brócoli (rico en colina), alteran la expresión génica de las especies bacterianas de estudio, *A. baumannii* y *S. marcescens*.

Se ha descrito el papel de la metilación del ADN por la ADN adenina metiltransferasa (Dam) en la regulación de la expresión de diversos genes bacterianos relacionados con la virulencia. Se sugiere que la metilación del ADN puede ser un mecanismo regulador amplio y versátil de la expresión de genes asociados a virulencia. La Dam cataliza la transferencia de un grupo metilo a partir de un sustrato donador de grupos metilo a la secuencia GATC del ADN, modulando la expresión génica diferencial de diversos microorganismos (Heussip y col., 2007).

En los resultados obtenidos, se sugiere que aquellas cepas que formaron biopelículas débiles en presencia del extracto de brócoli, se debe a la concentración de

la colina libre y compuestos relacionados, presentes en el extracto de brócoli. La colina, como molécula bioactiva, está afectando la adhesión bacteriana y, por ende, la formación de biopelículas (Miquel, 2016).

El extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL, disminuye la cantidad de biomasa formada de biopelículas de *S. marcescens* 4680, más no influye en la síntesis de sus componentes esenciales para la formación de biopelículas. Este hecho se respalda con los resultados obtenidos en ARC suplementado con extracto de brócoli diluido en metanol 2,5 mg/mL, 24 h de incubación a 37 °C.

Por otro lado, al evaluar la colina 2,5 mg/mL en solución acuosa al 50%, suplementada en los medios de cultivos: ARC y en CN, se determinó que disminuye significativamente el crecimiento bacteriano y la capacidad de formación de biopelículas de *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680.

Los resultados anteriores se sugiere que pudieran ser producto de la metilación del ADN por los grupos metilos de la colina, análogo al mecanismo regulador de variación de fase epigenética descrito de Pap pili en *Escherichia coli*, que implica la formación de patrones de metilación de ADN diferenciales donde los patrones de metilación, a su vez, controlan la expresión del gen pap (Van derWoude y col., 1996).

Por ejemplo, estudios han logrado demostrar el efecto de compuestos bioactivos presentes en el brócoli, utilizando como modelo un ratón con cáncer de próstata (*in vivo*); en este caso ese compuesto es el indol- 3- carbinol (I3C), que impide el crecimiento de tumores, este “apaga” el gen que codifica para una proteína (WWP1) que altera y debilita otra proteína supresora de tumores (PTEN). Luego en presencia del I3C se desencadena la actividad de PTEN de restringir el crecimiento tumoral (Lee y col., 2019). Análogo a esta ruta molecular es lo que pudiese estar ocurriendo con los

grupos metilo de la colina presente en el extracto de brócoli, pero en las células bacterianas, pudiendo ser un regulador amplio sobre la expresión de genes relacionados con la virulencia o formación de biopelículas de las mismas especies *A. baumannii* 5796 y *S. marcescens* 4680.

Para todos los ensayos realizados en este proyecto, se considera que los resultados obtenidos del crecimiento planctónico bacteriano, pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo formando biopelículas.

Estudios muestran que hasta el 30% de los genes pueden estar diferencialmente expresados entre la bacteria crecida en condiciones planctónicas y la misma crecida en formato de biopelícula. Por lo que, de un mismo genotipo bacteriano, se expresan distintos patrones de genes y fenotipos (Lasa, 2014). Lo que explica los resultados obtenidos, donde el crecimiento bacteriano no es una expresión directamente proporcional al desarrollo de biopelículas de *Acinetobacter baumannii* ni de *Serratia marcescens*.

Este estudio es base importante para la investigación clínica, ya que proporciona un interés renovado en el uso de extractos de brócoli y sus compuestos bioactivos, como la colina. Se conoce que infecciones bacterianas asociadas a la formación de biopelículas son difíciles de erradicar y presentan episodios recurrentes, debido precisamente a la estructura particular de estas agrupaciones bacterianas, recalcitrantes al tratamiento de agentes antimicrobianos (Mah&O'Toole, 2001). Por ejemplo, actualmente los patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos representan una gran amenaza para la salud humana (Lee y col., 2011).

Considerando también que el uso de antibióticos generalmente está limitado, se ha demostrado al menos en pacientes con infección por *E. coli* O157: H7, que las células bacterianas lisadas por el tratamiento con antibióticos liberan una cantidad

excesiva de toxina Shiga, lo que agrava el estado del paciente y produce HUS (Wong y col., 2000). Para evitar este riesgo, Lee y colaboradores, 2011 han propuesto un tratamiento antimicrobiano que consiste en atenuar la virulencia bacteriana mediante la inhibición de la detección de quórum sensing (QS) con extracto de brócoli (BE).

En sus resultados, el extracto de brócoli suprimió la producción de determinantes de virulencia en *Escherichia coli* O157: H7, dependiente de la dosis. Además, en una prueba de eficacia *in vivo*, utilizaron *Caenorhabditis elegans* como organismo huésped. *C. elegans* se alimentó de *E. coli* O157: H7 y en presencia del extracto de brócoli sobrevivió más tiempo que las alimentadas únicamente con las bacterias patógenas.

En base a este proyecto no puede responderse la interrogante de cuánto y si es bueno consumir brócoli para evitar la formación de biopelículas de bacterias patógenas causantes de infecciones nosocomiales en el ser humano, ya que la evaluación del efecto del extracto de brócoli realizada en este proyecto es *in vitro*, es decir, fuera de un organismo vivo, donde factores como la temperatura, medio y tiempo del cultivo son controlados y no *in vivo*, es decir, dentro de un organismo donde las condiciones y factores que pudiesen influir sobre el crecimiento y formación de biopelículas son completamente distintos.

Por lo tanto, se propone seguir el estudio de este extracto de alimento, rico en moléculas bioactivas donadoras de metilo, como enfoque alternativo para inhibir la infección bacteriana y formación de biopelículas, atenuar la virulencia y / o prevenir la adhesión bacteriana (Miquel, 2016) y proporcionar un control más seguro de la infección; hechos importantes en clínica.

8. CONCLUSIONES

- En agar RC (0,004 % m/v) suplementado con AC (0,001 % m/v) se distingue morfología de cepas: textura, color y borde a 37 °C, 24 h. La morfología de las colonias de *A. baumannii* N° 3988, 4848, 3910 y 4840 presentaron una textura lisa y color rosado; en cambio la morfología de las colonias de *A. baumannii* 6596, 7528, 2317 y 5796 son de textura rugosa y color blanco. Las 8 cepas de *A. baumannii* presentaron colonias de bordes estriados. Las cepas de *S. marcescens* en agar RC suplementado con AC, presentaron una morfología de colonia de textura rugosa, son de color rosado y borde definido.
- Evaluar formación de biopelículas sobre varillas de vidrio no se consideró adecuada ya que no se distingue un patrón de formación de biopelículas en ninguno de los tiempos y temperaturas ensayadas (24, 48, 72 y 96 h, a 28 y 37 °C).
- En tubo de ensayo puede estimarse el tiempo de formación de biopelículas de las especies *A. baumannii* y *S. marcescens*. Las 8 cepas de *A. baumannii* forman biopelículas moderadas a las 48 h de cultivo, en cambio, las 8 cepas de *S. marcescens* forman biopelículas moderadas a las 72 h.
- El extracto de brócoli diluido en metanol (1 y 2,5 mg/mL), disminuye la formación de biopelículas de *S. marcescens*, pasando de ser moderada a débil, no así la formación de biopelículas por *A. baumannii*, que se mantiene moderada.

- El extracto de brócoli diluido en metanol (2,5 mg/mL), disminuye la viabilidad celular de *S. marcescens* a las dos, cuatro y 48 h de cultivo, en cambio disminuye la viabilidad celular de *A. baumannii* sólo a las 72 h de cultivo.
- El extracto de brócoli concentrado (1 y 2,5 mg/mL), no afecta la formación de biopelículas de *S. marcescens* ni la formación de biopelículas de *A. baumannii*, ambas mantienen formación de biopelículas moderadas
- En presencia de colina (marca Sigma) 2,5 mg/mL, *S. marcescens* y *A. baumannii* no forman biopelículas a 37 °C en tubos de ensayo, a las 48 y 72 h respectivamente.

9. RECOMENDACIONES

9.1. Técnicas para evaluar formación de biopelículas bacterianas.

9.1.1. Agar Rojo Congo.

Se estandarizó añadiendo los colorantes directamente al agar (en estado sólido, mg) y en 50% de etanol según protocolo de Romling y col, 1998 (en estado líquido, mL).

Los resultados se visualizan mejor en el agar cuando el colorante se suplementa en estado líquido, ya que en estado sólido no hay una distribución homogénea en el agar; incluso, con agitación del medio previo a la solidificación del agar o si se añade antes o después de esterilizar por autoclave el agar nutritivo.

Los colorantes son compuestos orgánicos por lo que se sugiere no esterilizar por autoclave con el agar, ya que de hacerlo se desnaturalizan. Cuando se autoclavó el medio de AN suplementado con los colorantes, se visualizó que la mayoría de las cepas se observaron blancas, lo que significa que el colorante no se unió a la biomasa formada.

9.2. Efecto del extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas bacterianas.

Este estudio proporciona una base para seguir evaluando el efecto del Extracto de brócoli sobre la formación de biopelículas, de especies bacterianas patógenas nosocomiales oportunistas responsables de infecciones bacterianas en humanos. Para tener resultados más precisos que respondan a los objetivos planteados es importante considerar lo siguiente:

Aumentar el número de concentraciones a evaluar del extracto de brócoli y de la colina; así como, aumentar también el número de réplicas para disminuir el error experimental; también aumentar el número de cepas bacterianas de estudio. Determinar la concentración exacta de colina en el extracto específico a evaluar, aislarlo y comparar su efecto sobre el crecimiento, viabilidad celular y formación de biopelículas de *A. baumannii* y *S. marcescens* con el efecto observado utilizando colina pura.

Al evaluar el efecto del extracto de brócoli y la colina sobre biopelículas, considerar utilizar un método cuantitativo; pudiera ser con placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos.

Realizar un análisis cuantitativo de PCR en tiempo real para determinar la actividad del compuesto bioactivo derivado del brócoli sobre la expresión de genes de virulencia (Lee y col., 2011). Los análisis pueden combinarse con enfoques genómicos y proteómicos para la identificación de genes y proteínas que se expresen diferencialmente, junto con una caracterización completa de los mecanismos reguladores y las redes que medien los efectos en las diferentes cepas bacterianas a evaluar (Heussip y col, 2007).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdi-Ali, A., Hendiani, S., Mohammadi, P., Gharavi. 2014. Assesment of Biofilm formation and resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol.* **7(1)**:e8606.
- Branda, S., Vik, S., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*, **13**:20-26.
- Bridier, A; Briandet, R; Thomas, V; Dubois –Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial Biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and biofilm Research.* **27**: 1017 – 1032.
- Brown TA. 2002. Genomes. 2nd. Ed. U.K.: Wiley-Liss Manchester, p. 572.
- Carrillo, R., Peña, C., De la Torre, T., Meza, J., Flores, O. y Zepeda, A. 2015. Empiema por *Serratiamarcescens* paciente con neumonectomía. *MedInt Méx*; **31**:343-346.
- Choi, S.-W, Claycombe, K.J., Martinez, J. A., Friso, S., & Schalinske, K. L. (2013). *Nutritional epigenomics: A Portal to Disease Prevention. Advances in Nutrition*, **4(5)**, 530- 532.
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, 1318–1322. [CrossRef] [PubMed]
- Davey, M., & O’Toole, G. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol BiolRev*, **64**:847-867.
- De Araújo, H. W., de Freitas Siva, M., Lins, C. I., do Nascimento, A., da Silva, C. A., & Campos- Takaki, G. M. (2012). *Oxidation of dibenzothiophene (DBT) by Serratia marcescens UCP 1549 formed biphenyl as final product. Biotechnology for Biofuels*, **5(1)**, 33.

De la Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Fernández, L.; Hancock, R.E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr.Opin.Microbiol.* 2013, 16, 580–589. [CrossRef] [PubMed]

De Vos, W. M. (2015). Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes* 1, 15005

Donlan, R., & Costerton, J. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *ClinMicrobiolRev*, **15**:167-193.

Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*; **8 (9)**: 881-890.

Donkin, S.S. 2011. Rumen-protected choline. Department of Animal Sciences. Purdue University. <http://www.extension.org/pages/26158/rumen-protectedcholine> [Consulta: 23 de abril de 2018].

Espinal, P; Roca, I; Villa, J. (2011) Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non- baumannii *Acinetobacter* *Future Microbiol*: **(6)** 495- 511.

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). *Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology*, **14(9)**, 563- 575.

Fuqua, C. y Greenberg, E. P. 2002. Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. *Molecular Cell Biology* **3**: 685-695.

García, R., Ayala, P. y Perdomo, S. 2011. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud.* 10 (1): 59-71/59.

- Gualdi, L., Tagliabue, L., Bertagnoli, S., Lerano, T., De Castro, C. y Landini, P. 2008. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. *Microbiol* (2008), 154, 2017–2024.
- Hall, L., Costerton, J., Stoodley P. 2004. Bacterial Biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat rev Microbiol*. **2**: 95-108.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A. y Iqbal, M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis*; **15(4)**: 305-311.
- Heussip, G., Falker, S. y Schmidt, M.A. 2006. DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology* 297 (2007) 1–7.
- Ibarra, C.; Villar, M.; Gaitán, L.; Pozos, A.; Mendoza, R. y Sánchez L. 2012. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol*, **29(4)**: 214 – 222.
- Kaplan, J., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**:2633-2636.
- Lasa, I. 2014. Biofilms bacterianos. *Actualidad*. **37**:14-18.
- Lasa, I., Del Pozo, J., Penades, J., & Leiva, J. (2005). Bacterial biofilms and infection. *An Sist Sanit Navar*, **28**:163- 75.
- Lee, K.-M., Lim, J., Nam, S., Yoon, M. Y., Kwon, Y.-K., Jung, B. Y., Yoon, S. S. (2011). *Inhibitory effects of broccoli extract on Escherichia coli O157:H7 quorum sensing and in vivo virulence*. *FEMS Microbiology Letters*, 321(1), 67-74.

- Lynne, J., Hervé, A. (2010). Fisher's Least Significant Difference (LSD) Test. Encyclopedia of Research Design. Thousand Oaks, CA: Sage.
- Ma J, Shortliffe L D. 2004. Urinary tract infection in children: etiology and epidemiology. *UrolClin North Am*; **31**: 517-26.
- Madigan M., Martinko J., Dunlap P., Clark D. (2009) Brock biología de los microorganismos. Pearson Educación. Madrid, España
- Mah, T., & O'Toole, G. (2001).Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.*TrendsMicrobiol*, **9**:34-39.
- Mahlen, S. 2011.Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice. *ClinMicrobiol Rev*; **24** (4): 755–791.
- Martinez, O., Riverón, L., Alemán, A., Talavera, A., Montano, I., Soto, C., Diez, R., Araujo, L., Suárez, M. 2008. Selección de cepas de *Shigellasonnei* para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la shigellosis. *VacciMonitor*. N° 3.
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B. y Forestier C. 2016. Antibiofilm Activity as a Health Issue.Frontiers in Microbiology. Vol. 7.
- Navia, D., Villada, H., Mosquera, S. 2010. Las biopelículas en la industria de alimentos. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol 8, N° 2.
- Nazar, J. 2007. BacterialBiofilms. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. CabezaCuello*. **67**: 61-72.
- O'Toole, G., Kaplan, H., &Kolter, R. (2000).Biofilm formation as microbial development. *AnnuRevMicrobiol*, **54**:49-79.
- Peleg, A., Seifert, H. y Paterson D. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *ClinMicrobiolRev*; **21** (3): 538–582.

- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2008). *Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88**(5), 904-910.
- Pour, N., Dusane, D., Dhakephalkar, P., Zamin, F., Zinjarde, S., Chopade, B. 2011. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FemsImmunol Med Microbiol.* **62**: 328-338.
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. 2004. The role of biofilms in otolaryngologicinfections. *CurrOpinOtolaryngol Head Neck Surg*; **12**: 185-90.
- Puma, J. M. 2015. Evaluación del fenotipo de Resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas del hospital universitario de Caracas, creciendo en forma libre y formando biopelículas. (Tesis de pregrado). Universidad Central de Venezuela.
- Ramadan HH. 2006. Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *CurrOpinOtolaryngol Head Neck Surg* ; **14**(3): 183-6.
- Ramage G, VandeWalle K, Wickes LB, López-Ribot JC. 2001. Characteristics of biofilm Formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*; **18**: 163- 70.
- Rice, S., Koh, K., Queck, S., Labbate, M., Lam, K. y Kjelleberg, S. 2005. Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. *J Bacteriol.* **187**(10): 3477–3485.
- Roberts, I. S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 285-315.

Rodriguez–Martinez, J; Pascual, A; 2008. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **26**: 107- 14.

Romling, U., Sierralta, W.D, Ericksson, K., Normark, S. 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *MolMicrobiol* (1998) **28(2)**, 249–264.

Salinas, M. 2001. Anticuerpos Anti-*Nocardia brasiliensis* en pacientes con actinomicetoma y su utilidad clínica. Vol. 137, N° 1.

Singer, S. W. et al. (2010). Posttranslational modification and sequence variation of redox-active proteins correlate with biofilm life cycle in natural microbial communities. *ISME J.* **4**, 1348–1409.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D., & Costerton, J. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, **56**:187-209.

Sutherland, I.W. 1988. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *International Review of Cytology* Vol. 113. Academic Press.

Sutherland IW. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*; **147**:3-9.

Thomas JG, Nakaishi LA. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc*; **137**(suppl): 10S-15S.

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. 1999. Microbial extracellular polymeric substances. Springer Verlag. Berlin.

Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003) *Sip*, an integrase protein with excision, circularization and integration

activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *MolMicrobiol* **49**: 193-210.

Van der Woude, M., Braaten, B., Low, D. 1996. Epigenetic phase variation of the pap operon in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, **4(1)**, 5-9.

Yeom, J., Shin, J., Yang, J., Kim, J., Hwang, G. 2013. ¹H NMR-Based Metabolite Profiling of Planktonic and Biofilm Cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. *PLOS ONE*. **8(3)**: e57730.

Lee, Y-R; Chen, M., D.Lee, J., Zhang, J., Lin, S., Fu, T., Chen, H. y otros. 2019. Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC- WWP1 inhibitory pathway. *Science* **364**, 651.1-15.

Zhou, Y., Smith, D.R., Hufnagel, D. y Chapman, M.R. 2013.Experimental Manipulation of the Microbial Functional Amyloid Called Curli. *Methods Mol Biol*. 2013; **966**: 53-75.