

BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

IMPACTO DEL CULTIVO DE COBIA (<i>RACHYCENTRUM CANADUM</i>) SOBRE LAS COMUNIDADES BIOLÓGICAS DEL OESTE DE BAHÍA DE COCHINOS, CUBA. Alexander Lopeztegui Castillo, Pascual Rodríguez Cruzata y Diana Martínez Coello	7
EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>LIPPIA ALBA</i> SOBRE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES</i> (PENZ) PENZ Y <i>SACC.</i> EN FRUTOS DE GUAYABA (<i>PSIDIUM GUAJAVA L.</i>). Clemencia Guédez, Luis Cañizalez, Carmen Castillo y Rafael Olivar	21
ADHERENCIA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA SOBRE SUPERFICIES ABIÓTICAS LISAS EN <i>STAPHYLOCOCCUS SPP.</i> AISLADOS DE QUESOS ARTESANALES E INDUSTRIALES. Jhoandry Rivera Salazar, Velina Aranaga Natera, Gisela Reyes Hernández, Orlans Vega Luzardo, Luigi Ciancio Zerpa, Lorena Atencio de Guíñez e Irene Zabala Díaz.	38
MORFOLOGÍA DE LA PIEL DE <i>THECADACTYLUS RAPICAUDUS</i> (REPTILIA: SQUAMATA: GEKKONIDAE). Ana Morán de Alvarez, Zulamita Medina de Aguilar, Teresa Martínez Leones, Alfredo Briceño y Magareth Voelger	56
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES	70

Vol.52, Nº 1, Abril 2018

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



Adherencia y formación de biopelícula sobre superficies abióticas lisas en *Staphylococcus* spp. Aislados de quesos artesanales e industriales

Jhoandry Rivera Salazar, Velina Aranaga Natera, Gisela Reyes Hernández, Orlanys Vega Luzzardo, Luigi Ciancio Zerpa, Lorena Atencio de Guíñez e Irene Zabala Díaz.

Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Avenida Universidad, sector Grano de Oro. Maracaibo, Venezuela. Apartado 526. e-mail: jhoandrivas@gmail.com

Resumen

Las bacterias son capaces de persistir sobre superficies tras adherirse y producir exopolisacáridos; originando un sistema extracelular capaz de albergar comunidades microbianas que interactúan entre sí y con su ambiente, conocida como biopelículas. Esta investigación buscó evaluar la capacidad de adhesión a superficies lisas y la producción de exopolisacárido en presencia de dos fuentes de carbono en cepas de *Staphylococcus* spp. procedentes de quesos blancos manufacturados en Valledupar, Colombia. Se aislaron diferentes cepas de *Staphylococcus* (n= 25) a partir de los quesos de manufactura artesanal e industrial y se identificaron las especies por métodos bioquímicos, cuyos detalles técnicos y metodológicos debieron ser cuidadosos para evitar errores taxonómicos concluyentes sobre las especies del género *Staphylococcus*. La producción de exopolisacáridos se evaluó durante una semana en agar infusión cerebro-corazón suplementado con glucosa y/o sacarosa y, como revelador, rojo congo. La habilidad de las cepas para adherirse y producir biopelículas se evaluó en tubos de ensayos de vidrio y en microplacas de poliestireno, para ambos casos se utilizó como agente revelador cristal violeta. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 35 ± 2 °C. Las cepas identificadas correspondían a: *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. intermedius*, *S. hominis* y *S. haemolyticus*. La producción de exopolisacárido se vio mayormente influenciada cuando éstas crecieron en medios suplementados con glucosa en términos de 48 de horas incubación. Todas las cepas tuvieron la capacidad para adherirse y producir biopelícula sobre la superficie de vidrio y sólo algunas de éstas lo hicieron sobre la superficie de poliestireno, los resultados revisten importancia de salud pública considerando que las cepas de *Staphylococcus* estudiadas provienen de alimentos de consumo masivo lo que facilita su amplia diseminación tanto en ambientes industriales como comunitarios.

Palabras clave: *Staphylococcus*, exopolisacárido, biopelícula, superficies abióticas.

Adherence and biofilm formation on smooth abiotic surfaces in *Staphylococcus* spp. Isolated of artisan and industrial cheeses

Abstract

Bacteria are able to persist on surfaces after adhering and producing exopolysaccharides; originating an extracellular system capable of harboring microbial communities that interact with each other and with their environment, known as biofilms. This research aimed to evaluate the ability of adhesion to smooth surfaces and the production of exopolysaccharide in the presence of two carbon sources in strains of *Staphylococcus* spp. isolated from white cheeses manufactured in Valledupar, Colombia. Different strains of *Staphylococcus* (n = 25) were isolated from artisanal and industrial cheeses and the species were identified by biochemical methods, whose technical and methodological details had to be careful to avoid conclusive taxonomic errors on the species of the genus *Staphylococcus*. The production of exopolysaccharides was evaluated for one week on brain-heart infusion agar supplemented with glucose and/or sucrose and red congo as developer. The ability of the strains to adhere and produce biofilms was evaluated in glass tubes and in polystyrene microplates test, for both cases was used crystal violet as developer. All assays were carried out at 35 ± 2 °C. The strains identified corresponded to: *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. intermedius*, *S. hominis* and *S. haemolyticus*. Exopolisaccharide production was most influenced when they grew in media supplemented with glucose in terms of 48 hours of incubation. All strains had the ability to adhere and produce biofilm on the glass surface and only a few of them did so on the polystyrene surface, the results are of public health importance considering that the strains of *Staphylococcus* studied come from massive consumption foods, which facilitates their widespread dissemination in both industrial and community environments.

Key words: *Staphylococcus*, exopolysaccharide, biofilm, abiotic surfaces.

Introducción

Se conoce en la actualidad que la mayoría de las bacterias encontradas en ambientes naturales, clínica humana, clínica veterinaria e industriales son capaces de persistir en asociación con las superficies (bióticas o abióticas) por su habilidad de adherirse y producir exopolisacáridos; originando todo un sistema extracelular capaz de albergar una serie de comunidades microbianas compuestas de múltiples especies que interactúan entre sí y con su ambiente, mejor conocida como biopelículas (o *biofilms*). Existen amplios reportes que señalan la capacidad de producción de exopolisacáridos en géneros bacterianos relacionados a ambientes clínicos, comunitarios y alimentos, entre los que se mencionan están: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus*

cereus, *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* (Criado et al. 1994, Leriche y Carpentier 1995, Gilbert et al. 2003, Pompermayer y Gaylarde 2000, Chmielewski y Frank 2003, Gupta et al. 2016).

La composición química de los exopolisacáridos (también llamado glucocálix) es diferente en cada bacteria, e incluso, varía entre los géneros bacterianos; por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* se compone de alginato, en *S. typhimurium* es celulosa, rico en galactosa en *Vibrio cholerae* y poli-N-acetilglucosamina en *S. aureus* (Castrillón et al. 2010).

Las biopelículas se convierten en un problema de gran impacto en las industrias alimentarias, ambientes hospitalarios o clínicos (veterinario y humano) y comunitarios en general; ya que se producen en una gran variedad de superficies de contacto que involucra alimentos, tejidos animales con propósito alimenticio o no, tejidos humanos, prótesis, superficies de procesamiento en industrias, entre otros; causando en éstos ambientes grandes inconvenientes, tales como: infecciones persistentes, fracaso en tratamientos terapéuticos, fracaso en el aseguramiento de alimentos inocuos y en los peores casos pérdidas humanas. Por ello surge la necesidad de erradicar las biopelículas así como la de su agente etiológico en estos ambientes; ya que su presencia se traduce en grandes pérdidas económicas en las industrias y pérdidas humanas en nuestros entornos (O'Gara y Humphreys 2001, Kusumaningrum et al. 2003, Vasudevan et al. 2003, Marques et al. 2007, Stepanović et al. 2007, Namvar et al. 2013).

Por todo lo antes señalado, el objetivo de estudio fue evaluar la capacidad de adhesión a superficies lisas y la producción de exopolisacárido en cepas de *Staphylococcus* spp. bajo la influencia de glucosa y sacarosa como fuentes de carbono, ya que estas pueden favorecer o no la producción de exopolisacáridos, esto se debe a que por lo general esta matriz polisacarídica tiene una naturaleza aniónica y crea todo un sistema efectivo para atrapar y concentrar nutrientes esenciales y minerales del ambiente, aportando un amplio grado de protección contra amenazas del ambiente como: biocidas, antibióticos, anticuerpos, surfactantes, bacteriófagos y predadores externos como los glóbulos blancos. En esencia, esta matriz extracelular crea un ambiente tridimensional que rodea, ancla y protege las bacterias y hongos unidos a la superficie que colonizan potenciando no solo su capacidad de transferencia sino su patogenicidad así como la difícil erradicación de éstos en los distintos ambientes mencionados (Gilbert et al. 2003, Castrillón et al. 2010, Murugan et al. 2010, Namvar et al. 2013).

Materiales y Métodos

Procedencia, aislamiento e identificación taxonómica de las cepas estudiadas

Para este estudio de tipo experimental las cepas de *Staphylococcus* estudiadas (n= 25) fueron aisladas a partir de doce muestras de quesos blancos de manufactura artesanal (3 costeño blando, 3 costeño duro, 3 costeño semiduro) y de manufactura industrial (3 semidescremado) expendidos en la ciudad de Valledupar-Departamento del Cesar, Colombia. La preparación de las muestras de quesos y el aislamiento de las cepas se llevaron a cabo siguiendo los estándares de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (Comisión Venezolana de Normas Industriales 1989, Comisión Venezolana de Normas Industriales 2004). De cada muestra de queso, fueron tomadas de 3-5 colonias típicas de *Staphylococcus* para ser sembradas en caldo infusión cerebro-corazón (Merck, Alemania) e incubadas a 36 ± 2 °C por 18 horas. Se verificó la pureza de los cultivos mediante tinción de Gram y se procedió a preservarlas con glicerol al 20% v/v (Fischer Scientific, USA) a -20 °C en congelador horizontal (Premier, modelo CG-2439, China) (Ausubel *et al.* 2002). La confirmación del género y la denominación de la especie bacteriana entre las cepas estudiadas se llevó a cabo mediante ensayos bioquímicos miniaturizados; estandarizado para identificación de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria* API® Staph (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France). Las reacciones fueron reveladas, según indicaciones del fabricante, luego de su incubación a 36 ± 2 °C entre 18-24 horas. Finalmente, el género y especie de las cepas fueron obtenidas con ayuda del programa de interpretación API Staph versión 4.0.

Determinación de la producción de exopolisacárido en las cepas de *Staphylococcus* spp.

La habilidad de producir exopolisacáridos en las cepas de *Staphylococcus* consistió en el crecimiento de las cepas bacterianas, durante una semana a 36 ± 2 °C, sobre Agar Rojo Congo (RCA) que contenía como base por cada litro: 0,8 g de rojo congo; 36 g de caldo Infusión Cerebro-Corazón y 12 g de agar. A éste medio basal se le varió la fuente de carbohidrato (50 g/L de glucosa, 50 g/L de sacarosa y mezcla de ambas 25 g/L); cada caso en experimentos separados). Se identificaron las cepas productoras de exopolisacárido cuando su morfología colonial mostraba una textura rugosa y coloración negra, mientras que en aquellas cepas no productoras del exopolisacárido las colonias típicas fueran rojas y lisas, según descripción de Freeman *et al.* (1989). Se incluyeron en el ensayo las cepas *S. aureus* ATCC® 25923 y *S. aureus* COWAN I como controles positivos para las morfologías típicas y *P. aeruginosa* ATCC® 27853; *E. faecalis* ATCC® 29212 y *E. coli* ATCC® 35218 como controles negativos. Para este ensayo todas las cepas fueron previamente activadas en caldo tripticasa de soya-glucosado (0,25% p/v) (HiMedia, India) crecido durante 18-20 horas a 36 ± 2 °C.

Adherencia y producción de biopelícula de los *Staphylococcus* sobre superficies abióticas lisas

La habilidad de adhesión y producción de biopelículas de los *Staphylococcus* sobre superficie lisa de vidrio se demostró por el método descrito por Chritsensens et al. (1982) con modificaciones en este estudio, que consistieron básicamente en el crecimiento previo de las cepas en presencia de glucosa y el ajuste de la concentración celular de partida para el ensayo. Para ello se inocularon, con 100 μ L de cultivo previamente crecido (18-20 horas a 36 ± 2 °C) y ajustado al tubo número dos de la escala de McFarland, tubos de ensayos de vidrio que contenían 5 mL de caldo tripticasa de soya suplementado con 1% p/v de glucosa (HiMedia, India) y se incubaron a 36 ± 2 °C durante 48 horas. Pasado el período de incubación los cultivos crecidos fueron decantados y la biopelícula formada sobre las paredes del tubo de vidrio, fueron fijadas con acetato de sodio al 2% p/v durante tres minutos, para luego, realizar tres lavados con agua desionizada. Cada uno de los tubos fueron teñidos con una solución de cristal violeta (1% p/v) por 3 minutos y el exceso de cristal violeta se eliminó con tres lavados con agua desionizada. Finalmente, los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente en posición invertida sobre papel absorbente. Se demostró la adhesión y producción de biopelícula sobre las paredes del tubo de vidrio si se observaba de forma uniforme una película definida en toda la pared y en el fondo del tubo donde estuvo contenido el caldo de cultivo; luego se valoró cualitativamente la formación de biopelícula según el tono de cristal violeta observado: 0-ausente, 1-débil, 2-moderado y 3-fuerte. No se consideró como formación de biopelícula la única formación de un anillo en la zona de fase aire-líquido. Se incluyeron en el ensayo las cepas *S. aureus* ATCC® 25923 y *S. aureus* COWAN I como controles positivos y como control negativo un tubo con caldo tripticasa de soya glucosado sin inóculo que fue sometido a las mismas condiciones de incubación, fijación y revelado de la biopelícula.

La habilidad de adhesión y producción de biopelículas de los *Staphylococcus* sobre la superficie lisa de poliestireno se evidenció creciendo las cepas en microplacas de cultivos celulares siguiendo el método propuesto por Chritsensens et al. (1985). Las cepas fueron activadas en caldo tripticasa de soya suplementado con 0,25% p/v de glucosa (HiMedia, India) y crecidas toda una noche a 36 ± 2 °C. Al siguiente día, las cepas se diluyeron en proporción 1:100 en caldo tripticasa de soya glucosado (0,25% p/v) estéril y 200 μ L de esta suspensión microbiana fueron inoculados, por triplicado, en los pozos de las placas de microtitulación e incubados de 48 horas a 36 ± 2 °C. Por otra parte, se colocaron 200 μ L de caldo tripticasa de soya glucosado sin inocular como control negativo y de esterilidad. Como control positivo de adhesión y producción de biopelícula se colocaron en otros pozos las cepas *S. aureus* ATCC® 25923 y 6538; *S. aureus* COWAN I y *S. epidermidis* ATCC® 1228. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se decantaron y los pozos se lavaron tres veces con buffer PBS pH= 7.4, con el fin de remover del sistema las bacterias planctónicas. La biopelícula formada por las bacterias adheridas a las paredes de cada pozo se fijó con acetato de sodio al 2% p/v. por 15 minutos y des-

pués fueron teñidas con cristal violeta al 1% p/v., el exceso de colorante se eliminó con cuatro lavados utilizando agua desionizada. Finalmente, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente en posición invertida para luego ser llevadas a un lector de ELISA (Biorad, modelo 680) para ser medida la densidad óptica a una longitud de onda de 630 nm (DO_{630}). Los valores promedios de DO_{630} de los triplicados obtenidos de cada cepa se consideraron como el índice de biopelícula formado luego de la adhesión bacteriana a la superficie de cada pozo.

Los intervalos discriminatorios para calificar el poder de adhesión y formación de biopelícula sobre las microplacas de cultivo de tejido celular se calcularon siguiendo las deducciones descritas por Manijeh *et al.* (2008) con la modificaciones propias para esta investigación como sigue: en los supuestos casos donde se cumplió que: $DO_{630} \leq DO_c$: se consideró la cepa como no productora; $DO_c < DO_{630} \leq 2(DO_c)$: se consideró la cepa como débil productora; $2(DO_c) < DO_{630} \leq 3(DO_c)$: se consideró la cepa como moderadamente productora y donde $3(DO_c) < DO_{630}$: se consideró la cepa como fuerte productora. DO_c corresponde a la densidad óptica promedio del control negativo y DO_{630} corresponde a la densidad óptica promedio de cada cepa estudiada.

Análisis estadísticos

Los fenotipos de los *Staphylococcus* observados sobre rojo congo agar, la habilidad para adherirse y producir biopelículas sobre las superficies abióticas lisas de vidrio y de poliestireno fueron correlacionados mediante análisis de correlación múltiple en el paquete estadístico *Statgraphics plus* versión 5.1 con un nivel estadístico de significancia igual al 95%.

Resultados

Las cepas aisladas (n= 25) de los quesos muestreados se caracterizaron por ser cocos Gram positivos con arreglos en forma de racimos, vistas al microscopio, mientras que las pruebas bioquímicas por las cuales se les calificó como presuntivos *Staphylococcus*, además demostraron ser: productoras de la enzima catalasa y fermentadoras de glucosa tal como lo describen las literaturas para la clasificación clásica (MacFaddin 2000 y Hernández *et al.* 2005). Los resultados bioquímicos del método miniaturizado Api® Staph (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) indicaron que el 80,0 % de las cepas se correlacionaron con *S. aureus* y; el resto de las cepas, correspondían a las especies: *S. xylosus* (4,0 %), *S. intermedius* (4,0 %), *S. hominis* (4,0 %), y *S. haemolyticus* (8,0 %).

Entre los *Staphylococcus* estudiados se evidenciaron cepas con capacidad de producir la matriz de exopolisacárido, que compone la biopelícula bacteriana, al observarse la aparición de colonias negras rugosas sobre las placas de RCA (Fig. 1; C y D) una vez que se suplementaron con diversas fuentes de carbono: glucosa, sacarosa y mezcla de ambas.

También se observaron cepas no productoras del exopolisacárido cuyas colonias fueron de color rojo (Fig. 1; A y B). De las especies no-aureus, sólo *S. xylosus* fue incapaz de producir el exopolisacárido esperado en las diferentes fuentes de carbohidratos probadas.

Cuando la fuente de carbono en el medio agar rojo congo era glucosa (RCA-G), pudo observarse en las cepas de *Staphylococcus* spp. que, luego de 24 horas de incubación, el 24,0 % de las cepas mostraron colonias homogéneas negra/rugosas y un 4,0 % con coloración roja/lisas que caracterizan a las cepas de *Staphylococcus* como productoras y no-productoras del exopolisacárido, respectivamente, el cual sirve como matriz para la formación de biopelículas. En el 64,0 % de las cepas se observó la co-existencia de colonias negras y rojas (Fig. 1; A), siendo esto un fenómeno que señala que no todas las colonias de una misma cepa muestran precisamente la misma velocidad con la que producen el exopolisacárido. La aparición de colonias grisáceas (Fig. 1; B) entre la población estudiada de *Staphylococcus* se precisó en el 8,0 % de las cepas.

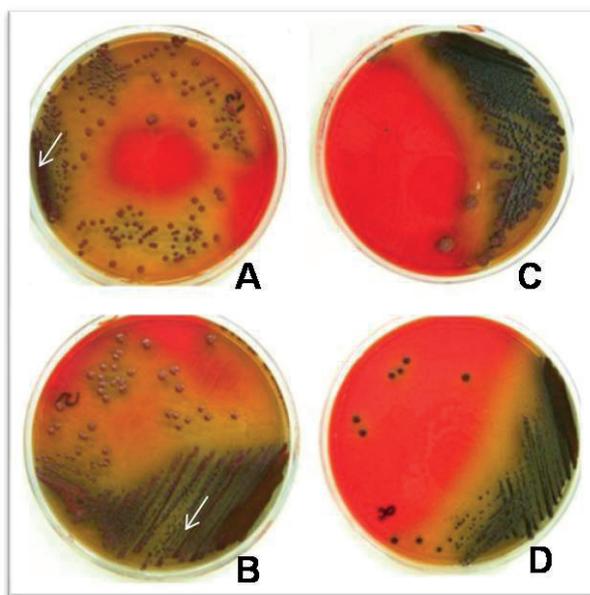


Figura 1.- Fenotipos observados en *Staphylococcus* spp. crecidos sobre el agar rojo congo. A y B: corresponden a colonias rojas/lisas típicas de *Staphylococcus* no-productoras de exopolisacáridos. La flecha, en la placa A indican colonias de la población productoras de exopolisacárido (negras) y en la placa B indican algunas colonias de la población con tendencia a producir exopolisacárido (grisáceas). C y D: corresponden a colonias negras/rugosas de *Staphylococcus* productoras de exopolisacáridos.

Transcurridas las 48 horas de incubación pudo observarse un incremento significativo de cepas positivas para la producción del exopolisacárido (44,0 %), desapareciendo por completo la co-existencia de colonias negras y rojas en aquellas cepas mencionadas anteriormente; así como también la desaparición de las tonalidades grisáceas de aquellas cepas que mostraron este fenotipo. Todos los *Staphylococcus* que resultaron negativos para la producción del exopolisacárido (56,0 %) al hacerle seguimiento a su morfología colonial, durante una semana, no se observaron cambios en la tonalidad roja.

Cuando la fuente de carbono en el RCA fue sustituido por sacarosa (RCA-S) se observó, a las 24 horas de incubación, que el 32,0 % de las cepas mostraba un fenotipo negativo para la producción del exopolisacárido, un 8,0 % tenía un aparente aspecto de positividad (negruzcas no rugosas) y el fenómeno fenotípico de aparición de colonias negras y rojas dentro de una misma población se hizo evidente en un 60,0 %, tal como cuando el ensayo se llevó a cabo con glucosa. Sin embargo, transcurridas las 48 horas de incubación; pudo notarse que el 100 % de las cepas de *Staphylococcus* mostraron un fenotipo colonial rojo y esto no varió luego de una semana de extensión de su incubación, lo que indica que las cepas de *Staphylococcus* estudiadas resultaron negativas para la producción del exopolisacárido, al término del tiempo transcurrido, cuando fueron expuesta a la sacarosa como única fuente de carbono.

Al ser evaluado el efecto de la glucosa y la sacarosa en concentraciones equimolares en el agar rojo congo (RCA-G/S) (Fig. 3) se pudo observar que, en las primeras 24 horas de crecimiento, el 16,0 % de las cepas mostraron los fenotipos característicos de cepas productoras de exopolisacárido, es decir; que este fenotipo duplicó su frecuencia si se compara con el ensayo de RCA-S. También se pudo apreciar que el 40,0 % de las cepas mostraron la aparición de colonias rojas y negras dentro de su misma población y, a diferencia de lo observado sobre RCA-S donde no se visualizó la aparición de cepas con fenotipos grisáceos, se pudo registrar que el 8,0 % de las cepas estudiadas tuvo ese comportamiento fenotípico. En el 36,0 % de las cepas se evidenció la no producción del exopolisacárido. Transcurridas las 48 horas de incubación, las frecuencias iniciales descritas se vieron modificadas observándose un 88,0 % de cepas con fenotipos característicos de cepas no-productoras de exopolisacárido y 12,0 % capaces de producirlo. No se observaron a este tiempo ni a posteriores, fenotipos grisáceos o colonias rojas y negras dentro la población para una misma cepa.

En la demostración de la capacidad de adhesión y formación de biopelícula sobre las superficies abióticas lisas ensayadas, se pudo revelar que el 100 % las cepas de *Staphylococcus* manifestaron éstas habilidades sobre la superficie de los tubos de ensayo de vidrio, dejando en evidencia que algunas cepas fueron capaces de formar mayor número de capas del polisacárido de adhesión intercelular y, por lo cual, se observó entre los tubos unas tonalidades de cristal violeta más fuerte que otras (Fig. 2). El conjunto de cepas con carácter débil para la adhesión sobre el material abiótico de vidrio estuvo representada por apenas un 8,0 % del total de

las cepas ensayadas, en este grupo cabe resaltar la cepa de *S. xylosus* no productora de exopolisacárido en los ensayos de RCA. Típicamente se observó entre las cepas de *Staphylococcus* una elevada frecuencia de cepas que mostraban mediana y fuerte adhesión sobre la superficie del tubo de ensayo de vidrio; las cuales estuvieron representadas por el 44,0 % y 48,0 % respectivamente.

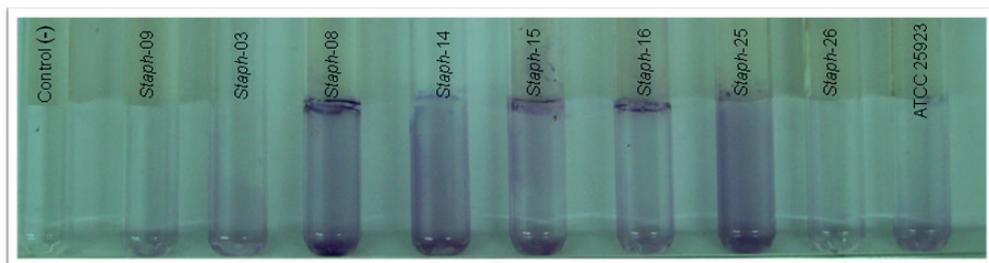


Figura 2.- Adhesión y formación de biopelículas sobre la superficie de los tubos de ensayos de vidrio en *Staphylococcus* spp. Las cepas *S. aureus* (Staph-09 y 26) muestran reacción débil, los *S. aureus* (Staph-03, 15 y ATCC 25923[®]) y *S. haemolyticus* (Staph-16) señalan reacción moderada y; *S. aureus* (Staph-08, 15) y *S. hominis* (Staph-25) muestran reacción fuerte. Control (-): tubo de ensayo que contuvo TSB-glucosa sin inocular e igualmente sometido a tinción con cristal violeta al 1% p/v.

La potencialidad para la adhesión y producción de biopelícula sobre la superficie abiótica lisa de poliestireno entre los *Staphylococcus* estudiados (Fig. 3) quedó demostrada al observar que un grupo de éstas (32,0 %) lograron generar la biopelícula efectivamente pudiéndolas clasificar como productoras fuertes con valores de absorbancia promedio de $0,54 \pm 0,44$ unidades.

El grupo adherente y caracterizado como moderados productores de biopelículas (12,0 %) tuvieron valores de absorbancia en el rango de $0,16 \pm 0,01$ unidades (entre estas estuvo *S. xylosus* no productora de exopolisacárido en los ensayos de RCA). Otra gran proporción de los aislados estudiados con capacidad adherente y con débil producción de biopelícula (36,0 %) tuvieron absorbancias oscilantes entre $0,08 \pm 0,02$. El grupo categorizado como no adherente, y consecuentemente, incapaces de formar la biopelícula sobre la microplacaplaca de poliestireno (20,0 %) tuvieron valores de absorbancia que fluctuaron alrededor de $0,060 \pm 0,01$ unidades.

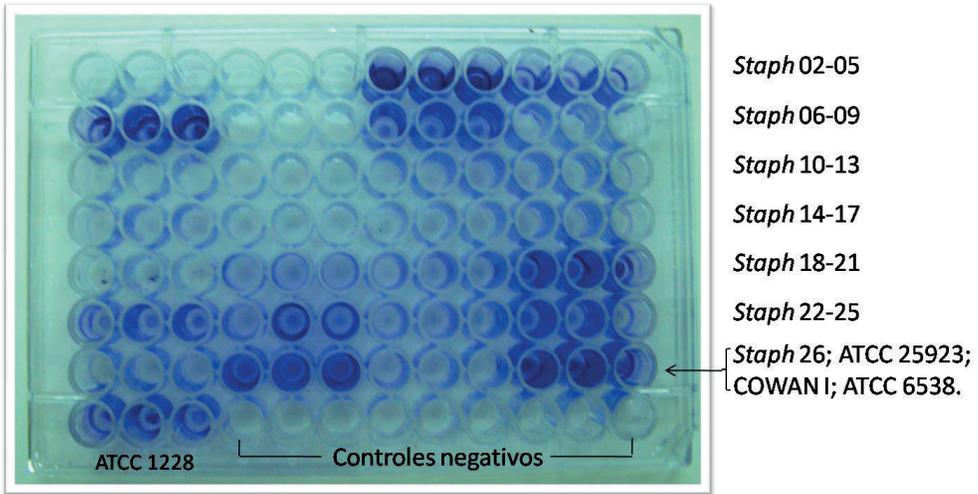


Figura 3.- Biopelículas formadas por los *Staphylococcus* sobre la superficie de la microplaca de poliestireno. De izquierda a derecha se observa, por triplicado, cada una de las cepas en estudio y controles incluidos.

En los análisis estadísticos no se encontró correlación significativa entre los fenotipos de los *Staphylococcus* observados en los ensayos de RCA, en cuanto a su adhesión y producción de biopelículas a las superficies lisas de vidrio ($r = -0,433$; $n = 25$; $p < 0,05$) ni a las superficies lisas de poliestireno ($r = -0,406$; $n = 25$; $p < 0,05$). Tampoco se halló correlación alguna al comparar los resultados de adhesión y producción de biopelículas de los *Staphylococcus* en ambas superficies abióticas lisas ensayadas ($r = 0,285$; $n = 25$; $p < 0,05$).

Discusión

Aún cuando las cepas de esta investigación fueron aisladas y caracterizadas bioquímicamente siguiendo las recomendaciones de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (2004) para el aislamiento e identificación de *S. aureus* a partir de muestras de alimentos, fue requerida una ampliación de las pruebas bioquímicas para llegar a confirmar adecuadamente la identificación taxonómica de las cepas aisladas a partir de los quesos y por lo que se recomienda hacer una actualización a la norma anteriormente citada.

Generalmente las normas o estándares para la identificación de *S. aureus* recomiendan la fermentación de manitol y la producción de la enzima coagulasa (libre o ligada) como características mínimas para diferenciarlos de otros *Staphylococcus*, sin embargo, existen ciertas interferencia técnicas que pueden conducir a falsos positivos o negativos en el ensayo de la determinación de la coagulasa. Ejemplos de ello son: la apreciación de la coagulación, la presencia de inadvertida

de CaCl_2 (que induce la coagulación), el tipo de suero empleado (siendo el de conejo o humano recomendados si las cepas son previamente crecidas en medios líquidos, a su vez que, no se recomienda la utilización de suero humano cuando las cepas han sido crecidas en medios sólidos) (MacFaddin 2000, Hernández et al. 2005). Por otro lado, otras especies estafilocócica son productoras de la enzima coagulasa tales como: *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. delphini*, *S. lutrae* y *S. hycus* (esta última encontrada en este estudio) aumentando la probabilidad de cometerse errores al identificar las especies del género *Staphylococcus* (Márcio et al. 2010, Hidalgo et al. 2011).

Otros factores intrínsecos al microorganismo han sido reportados como un fenómeno que puede llevar a un diagnóstico errado de las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, un ejemplo de ello es la aparición y diseminación en diferentes ambientes de cepas catalasa negativa con reportes que datan desde 1955 (Gonzales et al. 2009) y que se les asocia el detrimento de este factor de virulencia con la pérdida puntual del gen *katA* (Gruner et al. 2007, Piau et al. 2008).

Los resultados bioquímicos obtenidos durante la identificación taxonómica de las cepas estudiadas al igual como lo reseñan algunas literaturas (Gruner et al. 2007, Piau et al. 2008, Gonzales et al. 2009, Márcio et al. 2010, Hidalgo et al. 2011) enfatizan la importancia de cuidar los aspectos técnicos de laboratorio en el diagnóstico microbiológico de cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, sobre todo aquellos con potencialidades patogénicas, ya que esto puede conducir a diagnosticar el agente etiológico causante de alguna infección en humanos y/o animales o de contaminación en plantas procesadoras de alimentos pudiendo, muy probablemente, esto conducir a dificultar la(s) labor(es) cuando se plantean medidas para su erradicación en tales casos o ambientes respectivamente; traducándose en pérdidas de valor humano, temporal y económico.

Esta investigación al igual que los reportes de Ammendolia et al. (1999) y Rode et al. (2007) demuestra la aparición de cepas de *Staphylococcus* productoras de exopolisacáridos cuando son crecidas en medios ricos en glucosa versus medios carentes de éste carbohidrato y es un fenómeno también demostrado para *S. aureus* meticilino-resistentes (Fitzpatrick et al. 2005).

Los cambios fenotípicos de las cepas estudiadas sobre el RCA-G, en función de la extensión del tiempo de incubación, indican que existen *Staphylococcus* con población heterogénea que sintetizaron el exopolisacárido a diferentes velocidades. Por otro lado, los resultados señalan que la aparición de la tonalidad grisácea no es indicio fenotípico de una cepa débil productora del polisacárido extracelular como lo señala Růžicka et al. (2004) sino que se trata de cepas con tendencia lenta para producir tal matriz y éstas pueden ser clasificadas realmente como productoras o no del exopolisacárido con extensión de su período de incubación, que en este estudio reveló ser transcendental una incubación mínima de 48 horas.

Este hallazgo concuerda con lo reportado por Vasudevan *et al.* (2003) quienes consiguieron cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis en rumiantes y capaces de producir el exopolisacárido en términos de 24 a 48 horas tras su sembrado en agar rojo congo. Resultados similares a este estudio fueron reportados por Arciola *et al.* (2001) cuando describen a *S. aureus* como un productor de biopelícula más lento (de 48-72 horas) comparado con cepas de *S. epidermidis* el cual lo hace en términos de 24 horas.

El fenómeno registrado en el cambio fenotípico sobre RCA-S, que describía la reversión de las características propias de una cepa productora de exopolisacárido, puede ser explicado si se toma en cuenta que el medio infusión cerebro-corazón utilizado como base para la preparación del RCA tiene en su contenido total al menos 0,2 % p/v de glucosa; el cual es utilizado preferencialmente al inicio del crecimiento microbiano como fuente de carbono para la producción de energía y otros metabolitos requeridos durante el crecimiento propio de las cepas, por lo tanto, se presume que la glucosa del medio base pudo haber sido asimilada rápidamente por algunas cepas y, utilizada durante las primeras 24 horas, tanto para sus requerimientos nutricionales esenciales como para la producción del exopolisacárido. En este punto hay que destacar que la estructura básica del exopolisacárido que forman las biopelículas estafilococcal son poliglucosaaminas enlazadas mediante enlaces glicosídicos β -1,6, las cuales provienen directamente por anabolismo de glucosa (Götz 2002).

Esa última situación explica entonces la observación de algunas cepas de *Staphylococcus* con fenotipos tendentes a aparecer como cepas productoras de exopolisacárido en las primeras 24 horas y que se revierte el efecto negruzco hasta el tono rojo observado transcurrida las 48 horas, dejando en evidencia la no-producción del exopolisacárido en todas las cepas cuando el medio contiene mayormente sacarosa como fuente de carbono.

Cabe destacar que uno de los mecanismos por el cual ciertos miembros de la colonia, que se albergan bajo una matriz exopolimérica, pueden disgregarse de una biopelícula mediante liberación de exoenzimas que les pueden ser útiles no solo para la colonización de otros espacios sino también para disponer de fuentes de carbonos (u otras moléculas) de mas fácil catabolización en los momentos que se requieran para sobrevivir en medios complejos, entre las más utilizadas se encuentran: proteasas, glucosidasas, pectinasa, arabanasa, celulasa, hemicelulasa, β -glucanasa, xilanasas, glucosa oxidasa y lactoperoxidasa (Castrillón *et al.* 2010).

En los ensayos al ser suministrado tanto glucosa como sacarosa, pero en cantidad limitada, trascendió negativamente en la habilidad para poder producir el exopolisacárido dejando en evidencia además que, una vez agotada la glucosa del medio, la sacarosa no indujo la producción del polímero extracelular entre las cepas a pesar que su hidrólisis proporcionaría una molécula de glucosa; probablemente porque ésta es utilizada con preferencia para su metabolismo energético. Este resultado refleja y apoya la hipótesis, antes mencionada, sobre el rol que

juega la glucosa para la expresión y producción del exopolisacárido, el cual sin dudas funge como el carbohidrato que induce el mecanismo para la biosíntesis del principal precursor de la biopelícula en *Staphylococcus*, la N-acetilglucosamina (Götz 2002).

El comportamiento entre las cepas de *Staphylococcus* estudiadas, resultó un fenómeno bastante complejo al ser comparado con sus caracteres fenotípico sobre las placas de RCA-G y su adhesión a los tubos de vidrios y placa de poliestireno; ya que se esperaba observar que sólo las cepas con el fenotipo colonial negro/rugoso (en RCA) mostraran la habilidad de adherirse a esas superficies, sin embargo, los resultados revelaron que no siempre sucede esta relación y pueden observarse cepas que resultan negativas para la producción del exopolisacárido sobre el RCA con capacidad de adherirse a la superficie de contacto (vidrio o poliestireno e inclusive a ambas) y haciéndolo con amplios índices de adherencia.

Por otro lado, en esta investigación se detectaron cepas de *Staphylococcus* que no mostraron habilidad para adherirse sobre la superficie de poliestireno y en consecuencia no pudieron producir la biopelícula sobre tal superficie, sin embargo, sobre la superficie de vidrio todas las cepas mostraron ambas habilidades. Tales discrepancias tienen lugar por cuanto las propiedades físico-químicas de las superficies también tienen un rol importante sobre la influencia para la adhesión y formación de las biopelículas bacterianas.

Respecto a lo anteriormente señalado, los estudios concuerdan en que las superficies de vidrio son preferidos por los microorganismos precisamente por contar con alta energía superficial libre que les confiere un carácter hidrofílico por lo cual la adhesión se ve favorecida cuando la energía superficial de la bacteria es aún mayor a la del medio. En caso contrario, cuando un sustrato posee baja energía superficial libre éste es más bien hidrofóbico (como el poliestireno) y para favorecer la adhesión microbiana en este caso es necesario que la energía superficial del microorganismo sea aún menor que la del sustrato (Blackman y Frank 1996, Hyde et al. 1997, Mafu et al. 1990, Snide y Carballo 2000, Chmielewski y Frank 2003, Abalos 2005).

Por otro lado, el poder adherirse a cualquier superficie y producir biopelícula, también llegan a potenciar la patogenia entre las cepas *Staphylococcus* spp. estudiadas; precisamente porque estas últimas características contribuyen a que las mismas puedan invadir y sobrevivir en cualquier ambiente sin que existan limitaciones de espacio o disponibilidad de nutrientes, tales como: instrumentos y aparatos de procesamiento dentro de las industrias procesadoras de alimentos y/o prótesis, catéteres, instrumentos quirúrgicos y heridas en ambientes nosocomiales (Vogel et al. 2000, Arciola et al. 2001, Gilbert et al. 2003, Namvar et al. 2013).

El hecho de que las cepas de *Staphylococcus* spp. estudiadas hayan mostrado amplia capacidad de adhesión a materiales lisos (de poliestireno y vidrio) es preocupante si se considera que muchas herramientas que frecuentemente se utilizan

en ambientes industriales, clínicos, veterinarios, entre otros, tienen esta naturaleza. En tal sentido, cualquier superficie de contacto que tenga características fisicoquímicas similares al poliestireno o vidrio pueden actuar como sustrato que medien contaminaciones cruzadas dentro de los ambientes donde estas cepas se diseminen; sobre todo conociendo que la adhesión de las células bacterianas a superficies de contacto no sólo depende de ciertas limitaciones nutricionales o stress ambiental, sino que también puede depender de las propiedades de la superficie biótica o abiótica a la cual éstas se adhieren (Gilbert *et al.* 2003, Chmielewski y Frank 2003).

Los resultados descritos resaltan por su potencial impacto sobre la salud pública si se considera que las cepas de *Staphylococcus* provenían de un alimento de consumo masivo como el queso; y al que se le han atribuido brotes de toxoinfecciones relacionado directamente con *S. aureus* y sus toxinas, puesto que precisamente la habilidad de éstas cepas para biosintetizar exotoxinas y/o enterotoxinas pueden llevarse a cabo, incluso, dentro de la matriz del exopolisacárido y desde allí ser liberadas a su entorno; comprometiendo la salud de quienes ingieren los alimentos donde estos se encuentran asentados. Por otro lado, aunque estos agentes con potencialidad patogénica pudieran ser eliminados en su totalidad de estos alimentos (o de superficies de contacto) a través de diversos mecanismos de sanitización, muchas de sus toxinas resultan ser resistentes a éstos, tal es el caso de las toxinas termotolerantes que pueden persistir en un alimento, por ejemplo, posterior a una pasteurización.

Actualmente se sabe que muchas cepas de *Staphylococcus*, en especial *S. aureus*, despliegan su poder de formar biopelículas luego de su adhesión y dentro de ella emiten señales de comunicación en forma de lactonas homoserina como un mecanismo que ayuda al desarrollo rápido de esa matriz exopolimérica y con esta biopelícula han mostrado ser más resistentes a agentes antimicrobianos tales como: antibióticos, detergentes y soluciones sanitizantes y sumado a esto la dinámica genética inter e intra especie no se ve limitada dentro de este entorno ya que se tiene evidencia que dentro de la biopelícula pueden darse diversos mecanismos de transferencia genética como conjugación, transducción y transformación aumentando la diseminación de genes que confieren caracteres como la asimilación de ciertos compuestos y resistencia a agentes antimicrobianos (Donlan 2002, Gilbert *et al.* 2003, Mateo y Maestre 2004, Marques *et al.* 2007).

Todo lo señalado en este trabajo de investigación permite reflexionar sobre lo incontrolable que puede resultar la erradicación de éstos microorganismos que son capaces de adherirse a superficies de contactos y a su vez con la capacidad para formar biopelículas sobre estos, facilitando su diseminación en ambientes industriales, nosocomiales y comunitarios que pueden traducirse en pérdidas económicas y, peor aún, en pérdidas de vidas humanas.

Agradecimientos

A la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CONDES) dependencias de La Universidad del Zulia (LUZ) en Venezuela, por el parcial financiamiento de esta investigación. Al Banco de Sangre del municipio Maracaibo del estado Zulia-Venezuela, por el apoyo brindado con los equipos instrumentales requeridos.

Literatura Citada

- ÁBALOS, C. 2005. Adhesión bacteriana a biomateriales. *Avances Odontoestomat.* 21: 347-353.
- AMMENDOLIA, M. G., R. DI ROSA, L. MONTANARO, R. ARCIOLA Y L. BALDASSARRI. 1999. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin. Microbiol.* 37: 3235-3238.
- ARCIOLA, C. R., L. BALDASSARRI Y L. MONTANARO. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin. Microbiol.* 39: 2151-2156.
- AUSUBEL, F., R. BRENT, R. KINGSTONE, D. MOORE, J. SEIDMAN, J. SMITH Y K. STRUHL. 2002. Short Protocols in molecular Biology. A Compendium of Methods from Currents Protocols in Molecular Biology. Third Edition. Wiley Published by Jhon Wiley & Sons, Inc. Printed in the United States of America.
- BLACKMAN, I. Y J. FRANK. 1996. Growth of *Listeria Monocytogenes* as a biofilm on various food processing surfaces. *J Food Prot.* 59: 827-839.
- CASTRILLÓN, L. E., A. PALMA Y M. C. PADILLA. 2010. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatol Rev Mex.* 54: 14-24.
- CHMIELEWSKI, R. Y J. FRANK. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comp Rev Food Sci and Food Saf.* 2: 22-32.
- CHRISTENSENS, G., W. SIMPSON, A. BISNO Y E. BEACHEY. 1982. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 37: 318-326.
- CHRISTENSENS, G., W. SIMPSON, J. YOUNGER, L. BADDOUR, F. BARRETT, D. MELTON Y E. H. BEACHEY. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 22:996-1006.
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN 1292-04). 2004. Alimentos. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. Ministerio de Fomento. Editorial FONDONORMA. Caracas, Venezuela.

- CRIADO, M. T., B. SUAREZ Y C. M. FERREROS. 1994. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. *Food Technol.* 48: 123-126.
- DONLAN, R. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8: 881-890.
- FITZPATRICK, F., H. HUMPHREYS Y J. O'GARA. 2005. Evidence for *ica*A_{BC}-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43: 1973-1976.
- FREEMAN, D. J., F. R. FALKINER Y C. T. KEANE. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 42: 872-874.
- GILBERT, P., A. J. MCBAIN Y A. H. RICKARD. 2003. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *Int Biodeterior Biodegrad.* 51: 245 – 248.
- GONZALES, E., R. ANTIPARRA Y F. VILLARREAL. 2009. Aislamiento e identificación de una cepa de *Staphylococcus aureus* *meticilino* resistente y catalasa negativo. *An Fac Med.* 70: 45-46.
- GÖTZ, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 43: 1367-1378.
- GRUNER, B. M., S. R. HAN, H. G. MEYER, U. WULF, S. BHAKDI Y E. K. SIEGEL. 2007. Characterization of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J Clin Microbiol.* 45: 2684-2685.
- GUPTA, P., S. SARKAR, B. I. DAS, S. BHATTACHARJEE Y P. TRIBEDI. 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 198: 1-15.
- HERNÁNDEZ, O., D. DEL RÍOS, B. SANTANA, Y. FALCÓN, I. CASADO Y M. GALDÓS. 2005. Plasma equino como sustituto del plasma humano en la identificación del *Staphylococcus aureus* en los laboratorios de microbiología. *Rev Cubana Invest Biomed.* 24: 1-12.
- HIDALGO, F., M. GALARRAGA-GAY, M. GÓMEZ-FONTANIL Y J. SÁEZ-NIETO. 2011. *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus* catalasa negativa: un nuevo caso en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29: 708-709.
- HYDE, F. W., M. ALBERG Y K. SMITH. 1997. Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 19: 142-149.
- KUSUMANINGRUM, H., R. PALTINAITE, A. KOOMEN, W. HAZELEGER, F. ROMBOUTS Y R. BEUMER. 2003. Tolerance of *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to surface cleaning and household bleach. *J Food Protect.* 66: 2289-2295.
- LERICHE, V. Y B. CARPENTIER. 1995. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. *J. Food Prot.* 58: 1186-1191.

- MACFADDIN, J. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria. Third Edition. Editorial Lawrence McGraw. United State of America.
- MAFU, A., D. ROY, J. GOULET Y P. MAGNY. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact time. *J Food Prot.* 53: 742-746.
- MANIJEH, M., J. MOHAMMAD Y K. KERMANSHASHI. 2008. The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing environments. *Res J Microbiol.* 3: 181-186.
- MÁRCIO, G., L. VILELA, R. HILSDORF, D. JUNQUEIRA, U. PÁDUA, Y N. DA SILVA. 2010. Evaluation of a simplified key for the identification of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Acta Scient Biological Sci.* 32: 403-406.
- MARQUES, S. C., J. OLIVEIRA, L. DE FREITAS, B. CÁSSIA, E. ALVES, L. DE ABREU Y R. HILSDORF. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol.* 38: 538-543.
- MATEO, M. Y J. MAESTRE. 2004. Biofilm: modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap.* 17: 26-28.
- MURUGAN, K., M. USHA, P. MALATHI, A. S. AL-SOHAIBANI Y M. CHANDRASEKARAN. 2010. Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus* spp. among patients with conjunctivitis. *Pol J Microbiol.* 59: 233-239.
- NAMVAR, A., B. ASGHARI, F. EZZATIFAR, G. AZIZI Y A. LARI. 2013. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg Infect Control.* 8(1): Doc03.
- O'GARA, J. Y H. HUMPHREYS. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 50: 582-587.
- PIAU, C., J. JEHAN, R. LECLERCQ Y C. DAUREL. 2008. Catalase-negative *Staphylococcus aureus* strain with point mutations in the *katA* gene. *J Clin Microbiol.* 46: 2060-2061.
- POMPERMAYER, D. M. Y C. GAYLARDE. 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol.* 17: 361-365.
- RODE, T., S. LANGSRUD, A. HOLCK Y T. MØRETRØ. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol.* 116: 372-383.
- RŮŽIČKA, F., V. HOLÁ, M. VOTAVA, R. TEJKALOVÁ, R. HORVAT, M. HEROLDOVÁ Y V. WOZNICOVÁ. 2004. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol.* 49: 596-600.

- SINDE, E. y J. CARBALLO. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17: 439-447.
- STEPANOVIĆ, S., D. VUKOVIĆ, V. HOLA, G. BONAVENTURA, S. DJUKIĆ, I. ĆIRKOVIĆ y F. RUZICKA. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115: 891-899.
- VASUDEVAN, P., M. K. NAIR, T. ANNAMALAI y K. S. VENKITANARAYANAN. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 92: 179-185.
- VOGEL, L., J. SLOOS, J. SPAARGAREN, I. SUIKER y L. DIJKSHOORM. 2000. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diag Microbiol Infect Dis.* 36: 139-141.



**BOLETÍN DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Vol.52 N° 1 _____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en abril de 2018, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*