



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
Iztacala

TESIS Resistencia a antibióticos y movilidad bacteriana: El efecto del swarming y swimming sobre la resistencia al ciprofloxacino de *Pseudomonas sp.*

Presentada por Erick José López Arredondo

Para obtener el título de **BIOLÓGO**

Sinodales M. en C. Víctor Ramón Moreno Torres
Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza
Dr. Guillermo Ávila Acevedo
Dra. Ana García Bores
Dr. Víctor Rivera Aguilar



Los Reyes Iztacala a algún día de enero del 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Dedicatoria	1
Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Objetivos	9
Materiales y Métodos	10
Resultados	14
Discusión	18
Conclusión	20
Bibliografía	21

A las personas con las que aprendí a explicar el mundo con bacterias, pero especialmente a una persona que sin quererlo me mostro un mundo maravilloso en el que las bacterias, quizá, no sean tan importantes.

Resumen

En este estudio investigamos el efecto de los estados fisiológicos de swarming, swimming y planctónico de *Pseudomonas* sp. sobre su resistencia al ciprofloxacino y sobre la concentración de oxígeno del medio. Realizamos inducción diferencial de los 3 estados modificando la concentración de agar del medio e hicimos ensayos de resistencia por difusión de antibiótico en agar al mismo tiempo estimamos la concentración de oxígeno final en el medio utilizando indicadores redox. El estado que presentó mayor resistencia fue el planctónico, seguido del de swimming y finalmente del swarming. Se detectó una reducción en la concentración de oxígeno en los estados de swimming y planctónico. Concluimos que la tasa metabólica y la concentración de oxígeno se encuentran inversamente relacionadas con la resistencia a antibióticos.

Introducción

El estudio de la resistencia bacteriana a los antibióticos es de trascendental importancia por el enorme costo que esta ha tenido para la humanidad. Se estima que en el 2007 se produjeron 400,000 infecciones por bacterias resistentes a antibióticos, las cuales causaron 25,000 muertes en Europa. Al mismo tiempo, la resistencia a los antibióticos genera un gasto de 55 mil millones de dólares anuales, repartido entre gastos médicos y pérdidas laborales en Estados Unidos (Bush et al, 2011).

Los antibióticos son sustancias que en concentraciones bajas en comparación con otros compuestos actúan como antagonistas al desarrollo, causando la muerte o deteniendo el crecimiento microbiano. Estos tienen una enorme diversidad química y cada uno de ellos tiene un blanco y mecanismo de acción específico. Aunque todos ellos actúan interfiriendo con la fisiología bacteriana (Kohanski et al, 2010).

Podemos definir la fisiología como el conjunto de reacciones químicas y físicas que una bacteria realiza en respuesta al medio. La mayoría de las especies bacterianas pueden desarrollarse en múltiples hábitats, ya que tienen la capacidad de expresar diferentes estados fisiológicos dependiendo de en cual se encuentren (Kjeldgaard et al, 1958; Adler y Templeton, 1967).

Las dos formas más comunes de estudiar a las bacterias en el laboratorio son en cultivos líquidos o sólidos sobre agar, durante estos dos estados las bacterias expresan perfiles proteicos similares (Mikkelsen et al, 2007) por lo que es posible considerarlos como equivalentes, debido a esto en la literatura se les refiere como estado planctónico (Costerton et al, 1987).

El estado planctónico se caracteriza por la ausencia de movilidad activa y una tasa de replicación exponencial. Este estado es cotidianamente inducido por una alta concentración de nutrientes y una baja disponibilidad hídrica, sin embargo estas condiciones rara vez son encontradas durante la vida natural de las bacterias. Aun así, es durante este estado cuando se estudia la resistencia a antibióticos desde hace más de 90 años (Fleming, 1964).

Además del estado planctónico, existen al menos dos estados fisiológicos bacterianos más que son de suma importancia en los ciclos de vida bacterianos: el swarming y el swimming (Josenhans, 2002; Matz y S. Kjelleberg, 2005; Easom et al, 2008). Ambos son mecanismos de movilidad mediados por flagelos, sin embargo existen suficientes diferencias entre ellos como para considerar a cada uno como un fisiológico distinto (Armitage, 1981; Kim y Surette, 2004).

La concentración de agar del medio es el factor que causa la expresión diferencial entre el swarming y el swimming (Alberti y Harshey, 1990; Sharma y Anand, 2002; Verstraeten et al, 2008,). Por ejemplo *Pseudomonas sp.* realiza swarming en medios con una concentración de agar del 0.5% y swimming en concentraciones menores o iguales al 0.25% (Overhage et al, 2008).

Desde el punto de vista energético, existen dos diferencias importantes entre el swarming y el swimming. La primera es el número de flagelos (Harshey, 2004), durante el swimming las bacterias presentan uno o pocos flagelos, mientras que durante el swarming el número de flagelos se incrementa considerablemente. La segunda diferencia durante el swarming es la producción de factores de virulencia (pioverdina, piocianina, exotoxina y endoproteasas) y agentes tensoactivos (Caiazza et al, 2005) u osmóticos (Chen et al, 2007). Por lo anterior, podemos deducir que el swarming es un mecanismo de movilidad energéticamente más costoso que el swimming.

El incremento de las necesidades energéticas de las bacterias se puede ver reflejado en los medios altamente nutritivos que se requieren para la inducción de swarming (Zuino et al, 1994; Kearns, 2010), a diferencia de los utilizados para otros tipos de movilidad tales como el swimming, el twitching (Henrichsen, 1975) y el gliding (Gorski et al, 1993).

El elevado requerimiento energético del swarming es un fenómeno ampliamente distribuido entre las proteobacterias, ya que *Pseudomonas aureuginosa* (Tremblay y Deziel, 2010), *Salmonella typhimurium* (Kim y Surette, 2004) y *Escherichia coli* (Inoue et al, 2007) todas presentan un incremento en la transcripción de genes

relacionados con la síntesis de aminoácidos, ciclo de Krebs y varias ATP-sintetasas durante el swarming a diferencia del swimming.

El requerimiento energético de cada estado fisiológico tiene un efecto importante sobre la resistencia a los antibióticos, ya que este se relaciona directamente con tasa metabólica, la cual al incrementarse genera una mayor susceptibilidad a antibióticos (Toumanen et al, 1986; Gilbert et al, 1990; Brown et al, 1990). Múltiples estudios han mostrado que una tasa metabólica baja incrementa la resistencia a los antibióticos lo cual es independiente del modo de crecimiento ya que se ha visto tanto en células planctónicas en estado estacionario (Ashby et al, 1994; Spoering y Lewis, 2001) como en biopelículas (Brown et al, 1988; Evans et al, 1990, Stewart y Costerton, 2001), las cuales deben su resistencia a las poblaciones bacterianas en estado estacionario con una tasa metabólica disminuida (Drenkard y Frederick, 2000; Walters et al, 2003).

El estrés oxidativo es la conexión entre la tasa metabólica y la susceptibilidad a los antibióticos, esto se debe a que independientemente del blanco celular del antibiótico éste ejerce su actividad bactericida generando especies reactivas de oxígeno (Kohanski et al, 2007; Kohanski et al, 2010). Por lo tanto, la muerte celular es causada cuando la capacidad de los mecanismos antioxidantes celulares es superada por la suma del daño oxidativo generado por el antibiótico, el metabolismo celular y otros agentes pro oxidantes.

El efecto de los agentes pro oxidantes sobre las bacterias depende de la concentración de estos. Durante los ensayos de resistencia la concentración de agentes pro oxidantes como metales y vitaminas puede ser regulada para que su efecto sea igual en todos los estados fisiológicos. Sin embargo el oxígeno es uno de los agentes pro oxidantes más importantes y su concentración es modificada por el crecimiento bacteriano debido a que durante el estado planctónico (Loesche, 1969) y de swimming (Matsuyama et al, 1995) las bacterias tienen acceso al interior de la columna del medio en donde la difusión de oxígeno se encuentra limitada por el crecimiento bacteriano, mientras que en el estado de swarming las bacterias están limitadas a la superficie del medio (Benjacob et al, 2000).

La concentración de oxígeno es de gran importancia en los ensayos de resistencia, se ha reportado que concentraciones altas de oxígeno incrementan la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Knighton et al, 1986). Así mismo se ha visto que el crecimiento de bacterias en ambientes micro aerobios lleva al incremento en la resistencia a los antibióticos (Tresse et al, 1995; Walters et al, 2003; Borriello et al, 2004; Borriello et al, 2005).

La resistencia a los antibióticos de *Pseudomonas sp.* depende de su capacidad para contrarrestar la suma del estrés oxidativo generada por su metabolismo y el antibiótico. Durante sus diferentes estados fisiológicos tiene diferentes necesidades energéticas y en algunos casos acceso diferentes concentraciones de oxígeno. Suponemos que su resistencia al ciprofloxacino será mayor en el estado fisiológico que le permita contrarrestar con mayor efectividad el estrés oxidativo generado por el antibiótico. Proponemos que este estado será aquel que tenga un menor requerimiento energético y probablemente en el que tenga acceso a concentraciones bajas de oxígeno, por lo tanto nos preguntamos durante cuál de los estados fisiológicos mencionados anteriormente *Pseudomonas sp.* será más resistente al ciprofloxacino.

Objetivos

General

- Estudiar el efecto de los estados fisiológicos planctónico, swarming y swimming de *Pseudomonas sp.* sobre su resistencia al ciprofloxacino y el estado redox de su medio

Particulares

- Aislar una cepa de *Pseudomonas sp.* del suelo de Zapotitlán de las Salinas, Puebla.
- Inducir los estados fisiológicos de swarming, swimming y planctónico en *Pseudomonas sp.*
- Determinar la resistencia de *Pseudomonas sp.* al ciprofloxacino durante los estados fisiológicos de swarming, swimming y planctónico
- Determinar si los cambios en la resistencia de *Pseudomonas sp.* se deben al estado fisiológico o a la aparición de bacterias resistentes
- Determinar el efecto de los estados fisiológicos sobre el estado redox del medio

Materiales y métodos

Obtención y mantenimiento de *Pseudomonas sp.*

Un gramo de costra microbiana de Zapotitlán de las Salinas, Puebla fue disuelto en agua destilada estéril. Se realizaron 5 diluciones seriales hasta obtener una dilución 1/100000. 50 µL de esta dilución fueron inoculados en medio diferencial King B. Después de 48 horas se revisaron las cajas con luz ultravioleta para detectar pioverdina. Se seleccionó una colonia productora de pioverdina y se sembró por estrías en medio King B.

Los criterios utilizados para la determinación de *Pseudomonas sp.* fueron; forma celular bacilar, reacción de Gram negativa, movilidad positiva, sin producción de esporas, producción de gas negativa con glucosa y lactosa, catalasa positiva y producción de pioverdina (Topley, 2005).

La cepa de *Pseudomonas sp.* aislada fue colocada para su preservación en solución salina y glicerol (85/15 v/v), para su mantenimiento se colocó en agar King B a temperatura ambiente durante la duración del experimento. Se realizaron un máximo de 2 resiembras de las cajas de mantenimiento para asegurar la integridad genética de la cepa.

Inducción de estados fisiológicos

La inducción del swarming depende no solo de la concentración de agar sino de los nutrientes presentes en el medio, por lo tanto se probaron 5 medios diferentes; medio nutritivo, soya y caseína, King B sin glicerol, medio mínimo m8 y swarm E1 (8 g peptona, 3 g extracto de levadura), todos los medios fueron adicionados con 5 g de glucosa por litro y con una concentración de agar del 0.5%. Para determinar el estado de swarming se detectó la expresión diferencial de pioverdina mediante la exposición a luz ultravioleta. Ya que la producción es negativa en los frentes de swarming y positiva en el cuerpo de este (Tremblay y Deziel, 2010).

El medio de soya y caseína fue el que presentó mejores condiciones para el swarming, para reducir las variables se utilizó este mismo medio para la inducción

de los otros dos estados fisiológicos modificando únicamente la concentración de agar utilizando 0.25% para swimming y 1.5% para planctónico.

Ensayos de resistencia

Los ensayos de swarming se realizaron con medio de soya y caseína con 5 g de glucosa por litro y una concentración de agar del 0.5%, se colocaron 8ml del medio en cajas de Petri de vidrio de 8 cm de diámetro. Las cajas fueron secadas abiertas por 20 minutos en una campana de flujo laminar, en un extremo de la caja se colocó un disco de papel filtro con 15 μ g de ciprofloxacino o agua y en el extremo opuesto un inóculo de 5 μ L de *Pseudomonas sp.* de un cultivo líquido de toda la noche. Las cajas se incubaron por 48 h a temperatura ambiente y se midió la cobertura lineal como indicador de resistencia, se utilizó luz ultravioleta para detectar la producción diferencial de pioverdina como indicador de swarming.

Los ensayos de swimming se realizaron con medio de soya y caseína con 5 g de glucosa por litro y una concentración de agar del 0.25%. Estos se llevaron a cabo en cajas de Petri de vidrio de 8 cm, en las cajas se colocaron 8 ml de medio, en un extremo un disco de papel filtro con 15 μ g de ciprofloxacino o agua y en el extremo opuesto un inóculo de 5 μ L de *Pseudomonas sp.* de un cultivo líquido de toda la noche. Las cajas se incubaron por 48 h a temperatura ambiente y se midió la cobertura lineal como indicador de resistencia.

Se realizaron dos grupos de ensayos del estado planctónico, el “planctónico I” donde las bacterias solo tienen acceso a la superficie del medio y el “planctónico II” donde las bacterias fueron incluidas en el agar para permitir de esta manera que tuvieran acceso a la columna del medio.

Los ensayos del estado “planctónico I” se realizaron con medio de soya y caseína con 5 g de glucosa por litro y una concentración de agar del 1.5%, se colocaron 8ml del medio en cajas de Petri de vidrio de 8 cm de diámetro, se realizó una estría de bacterias con un hisopo utilizando un inóculo de un cultivo líquido de toda la noche, se colocó en uno de los extremos de la estría un disco con ciprofloxacino o agua y se midió la cobertura lineal como indicador de resistencia.

Los ensayos del estado “planctónico II” se realizaron con medio de soya y caseína con 5 g de glucosa por litro y una concentración de agar del 1.5%, el medio fue enfriado a 35°C e inoculado con 0.7×10^5 UFC/10ml de un cultivo de toda la noche, se colocaron 8ml del medio en cajas de Petri de vidrio de 8 cm de diámetro, se colocó en uno de los extremos de la estría un disco con ciprofloxacino o agua y se midió la cobertura lineal como indicador de resistencia, se realizaron 10 repeticiones. Todo lo anterior se repitió en 10 ocasiones.

Detección de bacterias resistentes

La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada por el método de microdiluciones (Goldman y Green, 2009) en medio de soya y caseína con 5 g de glucosa por litro. Para detectar la presencia de bacterias resistentes se tomó con un palillo una muestra de bacterias de la zona de crecimiento más cercana al disco de y se inoculo en tubos con caldo de soya y caseína con 0.5 µg de ciprofloxacino (MIC). Como control se utilizaron tubos con medio base sin antibiótico. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 48 horas y se determinó la existencia o ausencia de crecimiento bacteriano. Este procedimiento fue realizado en todos los ensayos de resistencia.

Determinación del efecto de los estados fisiológicos sobre el estado redox

El estado redox del medio después de los ensayos de resistencia fue utilizado como indicador de la concentración de oxígeno del medio, basándonos en el hecho de en el medio que existe equilibrio electroquímico y que las reacciones redox entre las tintaciones y las parejas redox del medio son reversibles (Rose y Long, 1988).

Se desarrolló un método para determinar colorimétricamente el estado redox del medio, en el cual se agregaron a los ensayos de resistencia los indicadores redox; azul de metileno (E^0 , $V = +0.01$) que en su estado oxidado es azul y en reducido incoloro y safranina (E^0 , $V = -0.29$) que es rosa en estado oxidado y transparente en el reducido.

Análisis estadísticos

Para determinar la significancia estadística de las diferencias encontradas entre la resistencia al ciprofloxacino durante los estados fisiológicos estudiados así como si la adición de los indicadores redox tuvo algún efecto sobre la resistencia se realizó un ANOVA de 2 vías con un alfa de 0.05 utilizando Microsoft Excel 2013.

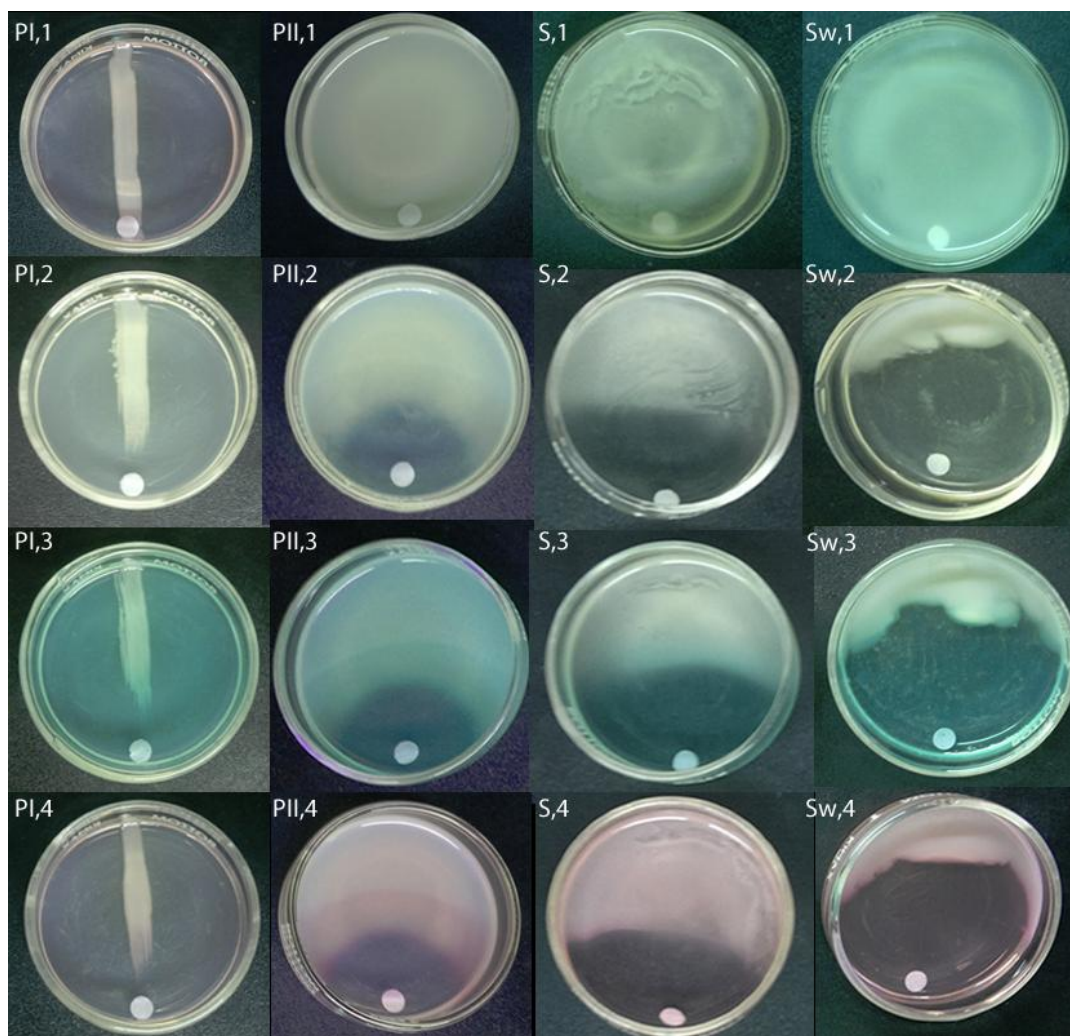
----- Este espacio fue dejado intencionalmente en blanco -----

Resultados

Ensayos de resistencia y estado redox del medio

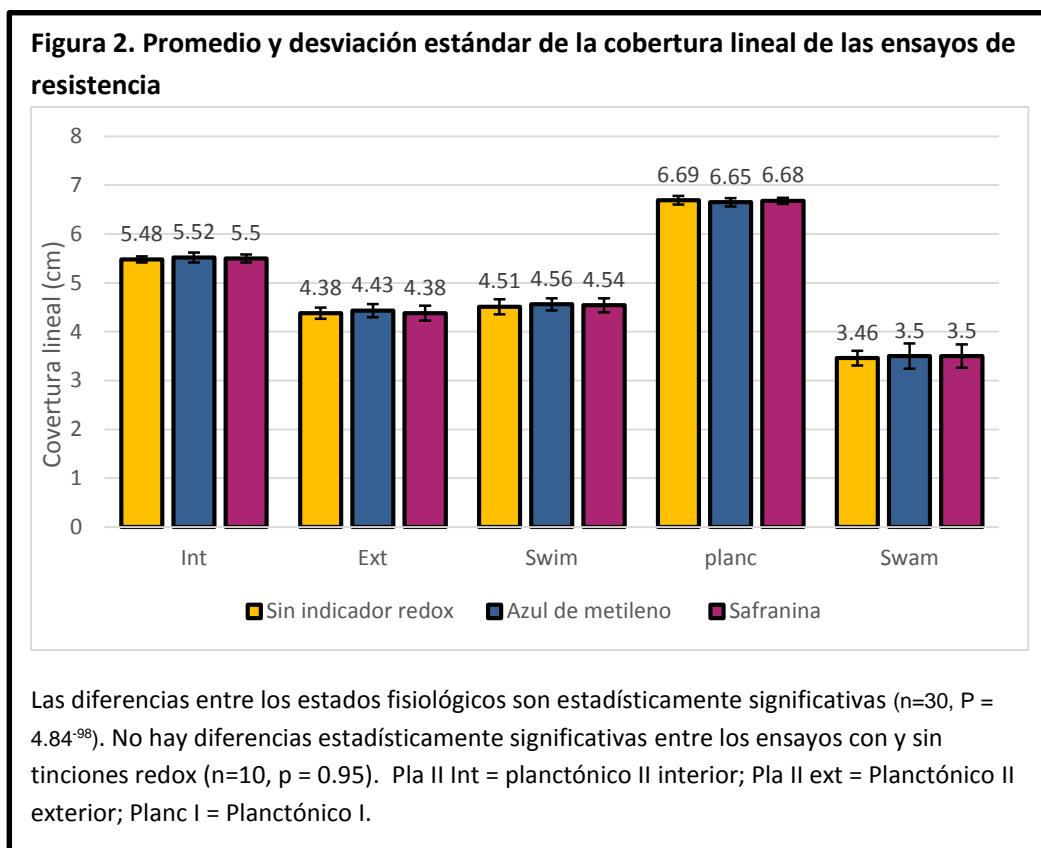
La resistencia de *Pseudomonas sp.* al ciprofloxacino fue afectada por su estado fisiológico. En los ensayos control con agua en lugar de ciprofloxacino siempre hubo cobertura lineal completa de la caja (figura 1, línea 1) a diferencia de los tratamientos con ciprofloxacino (Figura 1, líneas 2-4).

Figura 1. Ensayos de resistencia al ciprofloxacino



PI = Planctónico I, PII = Planctónico II, S = Swimming, Sw = Swarming, 1 = Control, 2 = Medio sin tinción redox, 3 = Medio con azul de metileno, 4 = Medio con safranina

El promedio de la cobertura lineal de ensayos de resistencia de los diferentes estados fisiológicos fue estadísticamente diferente entre todos los estados fisiológicos ($P = 4.84^{-98}$). La adición de indicadores redox no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre la resistencia al ciprofloxacino ($p = 0.95$) (figura 2).



La mayor resistencia al ciprofloxacino se detectó en el estado planctónico I, con una cobertura lineal promedio de 6.69 cm ($n = 10$, $\sigma = 0.09$), durante este las bacterias formaron una sola estría con elevación sobre el medio. En este estado no se detectó reducción del azul de metileno ni de safranina.

El estado planctónico II presentó dos zonas de crecimiento diferentes. Una primera zona donde hubo crecimiento bacteriano en la parte superior del medio, similar a una película sin elevación notable así como en la columna del medio y una segunda zona donde hubo crecimiento únicamente en la columna del medio (figura 3, a). De ahora en adelante nos referiremos a la primera zona como zona exterior y la segunda como zona interior.

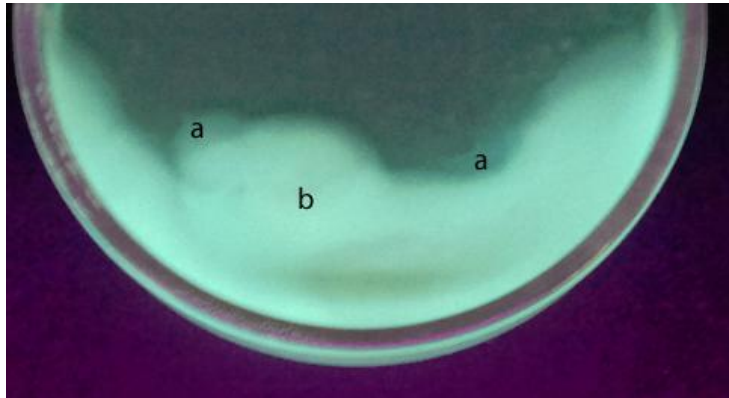


La zona interior del estado planctónico II fue la segunda en cuanto a resistencia con una cobertura lineal de 5.48 cm ($n = 10$, $\sigma = 0.06$), en esta zona se observó reducción del azul de metileno por debajo de la superficie del agar (figura 3, b), no hubo reducción de safranina.

La cobertura lineal promedio de zona exterior de inhibición del estado planctónico II fue de 4.3 cm ($n = 10$, $\sigma 0.11$). Esto fue similar al promedio de la cobertura del estado de swimming 4.5 cm ($n=10$, $\sigma = 0.15$), sin embargo las diferencias son estadísticamente significativas ($p = 4.84^{-98}$). El azul de metileno fue reducido en los ensayos de swimming, no hubo reducción en de swarming y en ninguno de los dos casos hubo reducción de safranina.

El swarming fue el estado que presentó menor resistencia al ciprofloxacino, con una cobertura lineal promedio de 3.46 cm ($n = 10$, $\sigma = 0.15$). Durante este estado no hubo reducción del azul de metileno. Se confirmó la expresión del estado por la producción diferencial de pioverdina en el cuerpo y frente del swarming (figura 4).

Figura 4. Producción diferencial de pioverdina



a) Frentes de swarming b) cuerpo del swarming

Prueba de aparición de bacterias resistentes

En todos los tubos con caldo de soya y caseína sin ciprofloxacino hubo crecimiento lo que muestra que el tamaño del inóculo y el medio permiten el crecimiento bacteriano. En ninguno de los tubos con ciprofloxacino se detectó crecimiento bacteriano, esto descarta que los resultados obtenidos hayan sido generados por la aparición de bacterias resistentes.

Discusión

Los resultados presentados muestran que el estado fisiológico tiene efecto sobre la resistencia al ciprofloxacino de *Pseudomonas sp.* Los ensayos de susceptibilidad mostraron que el estado fisiológico que le otorga mayor resistencia contra el ciprofloxacino es el planctónico con el cual tienen una cobertura lineal de 6.7 cm, seguido por el swimming con 4.5 cm y por el swarming con 3.46 cm. Se descartó que las diferencias hubieran sido causadas por la aparición de bacterias resistentes.

Los ensayos de resistencia demuestran que bajo las condiciones evaluadas *Pseudomonas sp.* es más resistente al ciprofloxacino durante estado planctónico que durante el swimming y el swarming. Estudios similares han reportado que la resistencia a los antibióticos es mayor durante el swarming (Kim y Surette, 2003; Overhage et al, 2008; Lai et al, 2009), sin embargo estos estudios no ofrecen una explicación sobre las causas del incremento en la resistencia. Nosotros proponemos que el cambio en la resistencia encontrado se debe a los diferentes requerimientos energéticos de los estados fisiológicos (Eloe et al, 2008; Tremblay y Deziel, 2010; Salvetti et al, 2011) y en la generación de micro ambientes con una baja concentración de oxígeno en relación a la atmosférica (Leboffe et al, 2011).

El ensayos del estado planctónico I y II presentaron diferencias significativas en la resistencia al ciprofloxacino. Atribuimos esto a que durante el estado planctónico I las bacterias se desarrollan como una colonia la cual puede actuar como una barrera selectiva para la difusión del antibiótico por la acción de las bombas efectoras de múltiples antibióticos (Kohler et al, 1997; Bambeke et al, 2003), las cuales son más eficientes cuando se encuentran estructuradas en biopelículas o colonias (Mah y O'Toole, 2001). Además de que dentro de las colonias también existen gradientes de oxígeno (Paerl y Prufert, 1987). Durante el estado planctónico II y el swimming, las bacterias presentaron una resistencia al ciprofloxacino similar con un promedio de 4.4 y 4.5 cm respectivamente. Durante estos dos estados las bacterias se desarrollan bajo condiciones similares, ya que tienen acceso a una zona del agar con condiciones micro anaerobias bajo las cuales las bacterias

incrementan su resistencia a los antibióticos (Tresse et al, 1995; Walters et al, 2003; Borriello et al, 2004; Borriello et al, 2005).

Atribuimos la formación de la zona exterior en el estado “plantónico II” a que en esta zona la concentración de antibiótico fue insuficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. Podemos confirmar esto ya que el crecimiento en esta zona es similar al de los controles. La zona interior se formó porque en esta zona la concentración de antibiótico únicamente permitió el crecimiento de las bacterias en el interior del medio cuya resistencia se incrementó por la menor concentración de oxígeno dentro del medio.

La reducción en la concentración de oxígeno en esta segunda zona de crecimiento durante los ensayos del estado planctónico II fue confirmada por la reducción del azul de metileno, sin embargo no se detectó reducción en la zona exterior ni en el control con agua, por lo que es asumimos que la reducción de la concentración de oxígeno dentro de la columna de medio fue inducida por la concentración sub inhibitoria de ciprofloxacino.

En los ensayos de swimming se detectó reducción del azul de metileno en toda la zona de crecimiento, tanto en los ensayos con ciprofloxacino como en los controles. Asumimos que la reducción fue causada por el consumo de oxígeno dentro del interior del medio, lo que refleja la demanda energética extra en comparación con el estado planctónico de las bacterias causada por el uso de flagelos para moverse en el agar.

El swimming fue el estado fisiológico que presentó menor resistencia al ciprofloxacino con 3.5 cm de cobertura lineal. Esto lo atribuimos a dos factores; el primero es que de todos los estados fisiológicos estudiados es el swarming es el de mayor demanda energética y el segundo es que durante el swarming las bacterias se encuentran limitadas a la superficie del agar (Benjacob et al, 2000) sin acceso a los gradientes de oxígeno del medio, pero a diferencia del estado planctónico durante el swarming las bacterias forman una película con agua que extraen del

medio (Cohen et al, 2001; Gerin et al, 2012) y suponemos que al hacerlo tienen un mayor contacto con el ciprofloxacino que se encuentra disuelto en ella.

Conclusión

El estudio de la resistencia a antibióticos es extremadamente complejo, debido al número de factores que están involucrados en ella. En este estudio mostramos que la resistencia se ve afectada por al menos tres factores; (1) el estado fisiológico, ya que todos los tratamientos mostraron diferencias significativas en la resistencia al ciprofloxacino; (2) por la concentración de oxígeno del medio, ya que los estados fisiológicos donde las bacterias tuvieron acceso a gradientes de oxígeno fueron los que presentaron mayor resistencia; (3) la distribución espacial de las bacterias en el medio, debido a que los ensayos del estado platónico I y II mostraron diferencias significativas entre ellos, teniéndola como única diferencia. Se requieren más estudios para determinar el efecto individual de cada uno de los factores.

Bibliografía

Adler, J., and B. Templeton. "The Effect of Environmental Conditions on the Motility of *Escherichia coli*." *Microbiology* 46.2 (1967): 175-84.

Alberti, L., and R M Harshey. "Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into Swimmer and Swarmer Cells." *Journal of Bacteriology* 172.8 (1990): 4322-328.

Armitage, J. P. "Changes in Metabolic Activity of *Proteus mirabilis* during Swarming." *Microbiology* 125.2 (1981): 445-50.

Ashby, M. J., J. E. Neale, S. J. Knott, and I. A. Critchley. "Effect of Antibiotics on Non-growing Planktonic Cells and Biofilms of *Escherichia coli*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 33.3 (1994): 443-52.

Bambeke, F. Van, Y. Glupczynski, P. Plésiat, J. C. Pechère, and P. M. Tulkens. "Antibiotic Efflux Pumps in Prokaryotic Cells: Occurrence, Impact on Resistance and Strategies for the Future of Antimicrobial Therapy." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (2003): 1055-065.

Benjacob, E., I. Cohen, I. Golding, D. Gutnick, M. Tcherpakov, D. Helbing, and I. Ron. "Bacterial Cooperative Organization under Antibiotic Stress." *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications* 282.1-2 (2000): 247-82.

Borriello, G., E. Werner, F. Roe, A. M. Kim, G. D. Ehrlich, and P. S. Stewart. "Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48.7 (2004): 2659-664.

Borriello, G., L. Richards, G. D. Ehrlich, and P. S. Stewart. "Arginine or Nitrate Enhances Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50.1 (2005): 382-84.

Brown, Michael R. W., Phillip J. Collier, And Peter Gilbert. "Influence of Growth Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agents: Modification of the Cell Envelope and Batch and Continuous Culture Studies." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34.9 (1990): 1623-628.

Brown, Michael R.W., David G. Allison, and Peter Gilbert. "Resistance of Bacterial Bionlms to Antibiotics: A Growth-rate Related Effect?" *Journal of Antimicrobial Chemotherap* 22 (1988): 777-83.

Bush K., Courvalin P., Dantas G., Davies J., Eisenstein B., Huovinen P., Jacoby G A.. "Tackling Antibiotic Resistance." *Nature Reviews Microbiology*, 2011.

Caiazza, N. C., R. M. Q. Shanks, and G. A. O'Toole. "Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Bacteriology* 187.21 (2005): 7351-361.

Chen, B. G., L. Turner, and H. C. Berg. "The Wetting Agent Required for Swarming in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Not a Surfactant." *Journal of Bacteriology* 189.23 (2007): 8750-753.

Cohen, I., I. Golding, I. G. Ron, And E. Ben-Jacob. "Biofluidynamics Of Lubricating Bacteria." Mathematical Methods In The Applied Sciences 24 (2001): 1429-468.

Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. "Bacterial Biofilms in Nature and Disease." *Annual Review of Microbiology* 41.1 (1987): 435-64.

Drenkard, Eliana, and Frederick M. Ausubel. "Pseudomonas Biofilm Formation and Antibiotic Resistance Are Linked to Phenotypic Variation." *Nature* 416 (2002): 740-43.

Easom, Catherine A., and David J. Clarke. "Motility Is Required for the Competitive Fitness of Entomopathogenic *Photobacterium luminescens* during Insect Infection." *BMC Microbiology* 8.1 (2008): 168.

Eloe, E. A., F. M. Lauro, R. F. Vogel, and D. H. Bartlett. "The Deep-Sea Bacterium *Photobacterium profundum* SS9 Utilizes Separate Flagellar Systems for Swimming and Swarming under High-Pressure Conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 74.20 (2008): 6298-305.

Evans, D. J., D. G. Allison, M. R. W. Brown, and P. Gilbert. "Effect of Growth-rate on Resistance of Gram-negative Biofilms to Ceftriaxone." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 26.4 (1990): 473-78.

Fleming Alexander. "Nobel Lecture: Penicillin". *Physiology or Medicine 1942-1962*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964

Gerin, C., C. Deroulers, B. Grammaticos, and M. Badoual. "Modeling the role of water in *Bacillus subtilis* colonies." Physical Review E 85 (2012).

Gilbert, Peter, Phillip J. Collier, and Michael R.W. Brown. "Influence of Growth Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agents: Biofilms, Cell Cycle, Dormancy, and Stringent Response." *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 34.10 (1990): 1865-868.

Goldman, Emanuel, and Lorrence H. Green. *Practical Handbook of Microbiology*. Boca Raton: CRC, 2009.

Gorski, Lisa, Walter Godchaux, and Edward R. Leadbetter. "Structural Specificity of Sugars That Inhibit Gliding Motility of *Cytophaga johnsonae*." *Archives of Microbiology* 160.2 (1993): 121-25.

Harshey, Rasika M. "Bees Aren't the Only Ones: Swarming in Gram-negative Bacteria." *Molecular Microbiology* 13.3 (2004): 389-94.

Henrichsen, Jorgen. "The Influence of Changes in the Environment on Twitching Motility." *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 83.3 (1975): 179-86.

Inoue, T., R. Shingaki, S. Hirose, K. Waki, H. Mori, and K. Fukui. "Genome-Wide Screening of Genes Required for Swarming Motility in *Escherichia coli* K-12." *Journal of Bacteriology* 189.3 (2007): 950-57.

Josenhans, C. "The Role of Motility as a Virulence Factor in Bacteria." *International Journal of Medical Microbiology* 291.8 (2002): 605-14.

Kearns, Daniel B. "A Field Guide to Bacterial Swarming Motility." *Nature Reviews Microbiology* 8 (2010): 634-44.

Kim, Wook, and Michael G. Surette. "Metabolic Differentiation in Actively Swarming Salmonella." *Molecular Microbiology* 54.3 (2004): 702-14.

Kim, Wook, and Michael G. Surette. "Swarming Populations Of Salmonella Represent a Unique Physiological State Coupled to Multiple Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Biological Procedures Online* 5.1 (2003): 189-96.

Kjeldgaard, N. O., O. MaalOe, and M. Schaechter. "The Transition Between Different Physiological States During Balanced Growth of Salmonella Typhimurium." *Microbiology* 19.3 (1958): 607-16

Knighton K. David, Halliday Betty, Hunt K. Thomas. "A Comparison of the Effects of Inspired Oxygen Concentration and Antibiotic Administration on In Vivo Bacterial Clearance." *JAMA Surgery* 121.2 (1986): 191-95

Kohanski, M., D. Dwyer, B. Hayete, C. Lawrence, and J. Collins. "A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics." *Cell* 130.5 (2007): 797-810.

Kohanski, Michael A., Daniel J. Dwyer, and James J. Collins. "How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks." *Nature Reviews Microbiology* 8.6 (2010): 423-35.

Kohler, Thilo, Mehri Michea-Hamzeshpour, Patrick Plesiat, Anne-Lise Kahr, And Jean-Claude E Pechere. "Differential Selection Of Multidrug Efflux Systems By

Quinolones In *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrobial Agents And Chemotherapy 41 (1997): 2540-543.

Lai, Sandra, Julien Tremblay, and Eric Déziel. "Swarming Motility: A Multicellular Behaviour Conferring Antimicrobial Resistance." *Environmental Microbiology* 11.1 (2009): 126-36.

Leboffe, Michael J., Burton E. Pierce, and Michael J. Leboffe. *A Photographic Atlas for the 4th Edition Microbiology Laboratory*. Englewood, CO: Morton Pub., 2011.

Loesche, Walter J. "Oxygen Sensitivity of Various Anaerobic Bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 18 (1969): 723-27.

Mah, Thien-Fah C., and George A. O'Toole. "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." TRENDS in Microbiology 9 (2001): 34-39.

Matsuyama, T., A. Bhasin, and R M Harshey. "Mutational Analysis of Flagellum-independent Surface Spreading of *Serratia marcescens* 274 on a Low-agar Medium." *Journal of Bacteriology* 1995th ser. 177.4 (1995): 987-91.

Matz, C., and S. Kjelleberg. "Off the Hook – How Bacteria Survive Protozoan Grazing." *Trends in Microbiology* 13.7 (2005): 302-07.

Mikkelsen, H., Z. Duck, K. S. Lilley, and M. Welch. "Interrelationships between Colonies, Biofilms, and Planktonic Cells of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Journal of Bacteriology* 189.6 (2007): 2411-416

Overhage, J., M. Bains, M. D. Brazas, and R. E. W. Hancock. "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Complex Adaptation Leading to Increased Production of Virulence Factors and Antibiotic Resistance." *Journal of Bacteriology* 190.8 (2008): 2671-679.

Paerl, Hans W., And Leslie E. Prufert. "Oxygen-Poor Microzones As Potential Sites Of Microbial N₂ Fixation In Nitrogen-Depleted Aerobic Marine Waters" *Deep Sea Research Part B. Oceanographic Literature Review* 34 (1987): 988-89

Rose, Seth, and Austin Long. "Monitoring Dissolved Oxygen in Ground Water: Some Basic Considerations." *Ground Water Monitoring & Remediation* 8.1 (1988): 93-97.

Salveti, Sara, Karoline Faegri, Emilia Ghelardi, Anne-Brit Kolstø, and Sonia Senesi. "Global Gene Expression Profile for Swarming *Bacillus cereus* Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 77.15 (2011): 5149-156.

Sharma, Manvi, and S. K. Anand. "Swarming: A Coordinated Bacterial Activity." *Current Science* 83.6 (2002): 707-15.

Spoering, Amy L., and Kim Lewis. "Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials." *Journal of Bacteriology* 183.23 (2001): 6746-751.

Stewart, P. "Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms." *International Journal of Medical Microbiology* 292.2 (2002): 107-13.

Stewart, P., and J. William Costerton. "Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms." *The Lancet* 358.9276 (2001): 135-38.

Topley, W. W. C. "Pseudomonas." *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*. London: Hodder Arnold, 2005.

Toumanen, E., R. Cozens, W. Tosch, O. Zak, and A. Tomasz. "The Rate of Killing of *Escherichia coli* by P-Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth." *Journal of General Microbiology* 132 (1986): 1297-304.

Tremblay, Julien, and Eric Deziel. "Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Swarming Motility." *BMC Genomics* 11.1 (2010): 587.

Tresse, O., T. Jouenne, and G.-A. Junter. "The Role of Oxygen Limitation in the Resistance of Agar-entrapped, Sessile-like *Escherichia coli* to Aminoglycoside and β -lactam Antibiotics." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36.3 (1995): 521-26.

Verstraeten, N., K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant, and J. Michiels. "Living on a Surface: Swarming and Biofilm Formation." *Trends in Microbiology* 16.10 (2008): 496-506.

Walters, M. C., F. Roe, A. Bugnicourt, M. J. Franklin, and P. S. Stewart. "Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47.1 (2003): 317-23.

Zunino, P., C. Piccini, and C. Legnani-Fajardo. "Flagellate and Non-flagellate *Proteus Mirabilis* in the Development of Experimental Urinary Tract Infection." *Microbial Pathogenesis* 16.5 (1994): 379-85.