



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**PELEAR O CORRER: EL EFECTO DE CONCENTRACIONES
SUBINHIBITORIAS DE CIPROFLOXACINO SOBRE LA
ESTRUCTURA DE BIOPELÍCULAS DE *PSEUDOMONAS
FLUORESCENS*.**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGA

PRESENTA:

VALERIA GALINDOTAPIA

DIRECTOR DE TESIS:

ERICK JOSE LÓPEZ ARREDONDO



Los Reyes Iztacala, E stado
de México, 2019



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

Resumen	
Marco teórico	1
Biopelículas	2
Estructura de las biopelículas	3
Modelos para el estudio de biopelículas	4
Antibióticos	6
Resistencia bacteriana a los antibióticos	9
Relación entre las biopelículas y los antibióticos	10
Introducción	12
Pregunta de investigación	13
Objetivo general	13
Objetivos particulares	13
Materiales y métodos	
Mantenimiento y cultivo de <i>P. fluorescens</i>	14
Diseño experimental	14
Procesamiento de datos	15
Resultados	17
Discusión	21
Conclusión	22
Bibliografía citada	23

Índice de figuras

- Figura 1. Formación y desarrollo de una biopelícula de *Pseudomonas sp.*
- Figura 2. Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos
- Figura 3. Procesamiento de las imágenes para el análisis de la cobertura y densidad de las biopelículas de *P. fluorescens* en los diferentes tratamientos.
- Figura 4. Estructura microscópica de las biopelículas maduras de *P. fluorescens* antes y después de su exposición a concentraciones subinhibitorias.
- Figura 5. Cobertura total de las biopelículas de *P. fluorescens* expuestas a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino.
- Figura 6. Efecto de la exposición de biopelículas de *P. fluorescens* maduras por 48 horas a diferentes concentraciones de ciprofloxacino.
- Figura 7. Relación entre el tamaño de las biopelículas y el porcentaje de dispersión de las biopelículas de *P. fluorescens* expuestas a concentraciones subinhibitorias de Ciprofloxacino.
- Figura 8. Mecanismo propuesto de dispersión inducido por concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino en biopelículas de *P. fluorescens*

Índice de tablas

- Tabla 1. Modelos de bacterias para el estudio de biopelículas.
- Tabla 2. Principales tipos de antibiótico y sus descripciones
- Tabla 3. Definición de las clases de biopelículas de acuerdo al tamaño y número de bacterias.

Resumen

Las biopelículas son una forma de vida bacteriana, estas se encuentran presentes en la mayoría de los medios. Esta forma de vida se caracteriza por la adhesión de las bacterias a una superficie, la síntesis de Sustancias Poliméricas Extracelulares y la formación de microambientes los que les otorgan propiedades emergentes como la resistencia a antibióticos. Las biopelículas están presentes en el 40% de las infecciones en humanos lo que las hace de gran importancia clínica, sin embargo, los esquemas de antibiótico no las eliminan debido a que estas incrementan la resistencia a los antibióticos marcadamente. En este estudio determinamos el efecto de dos concentraciones subinhibitorias de Ciprofloxacino sobre la estructura de las biopelículas de 72 horas de *Pseudomonas fluorescens*. Encontramos que la exposición de las biopelículas a concentraciones subinhibitorias induce la dispersión de estas, esta depende de la concentración de antibiótico, adicionalmente encontramos que en concentraciones altas la dispersión depende de tamaño de la biopelícula, mientras que en concentraciones bajas la dispersión es homogénea. Consideramos que esto es un punto de partida para el estudio de la dispersión inducida por concentraciones subinhibitorias de antibióticos.

Marco teórico

Biopelículas

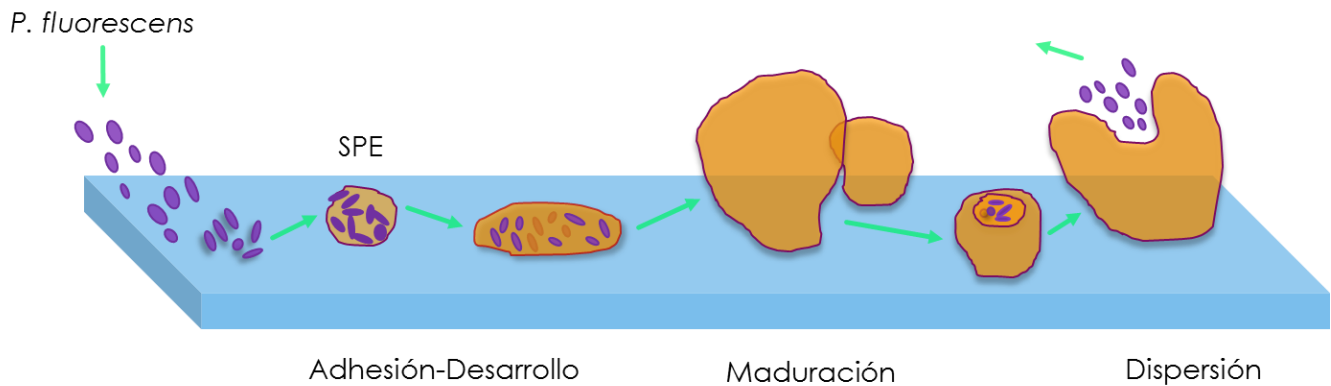
Las biopelículas representan una problemática mundial debido a que se encuentran en el 60 % de todas las infecciones en humanos (Keren, Kaldalu, Spoering, Wang, & Lewis, 2004). Un ejemplo es el de biopelículas formadas por *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* que están presentes en infecciones como caries, gingivitis y periodontitis (Lasa, Pozo, & De, 2016). Otro ejemplo de estas ocurre en los implantes médicos como; válvulas cardiacas, catéteres de línea central, intravenosos y urinarios donde se involucran bacterias como: *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Teresa Herrera Mendoza Bac Esp & Revisión, 2004).

Las biopelículas se encuentran de manera común. Son un modo de crecimiento bacteriano presente en la mayoría de las especies de bacterias. Este crecimiento consiste en adherirse a una superficie creando una interface líquido-sólido, gas-líquido o sólido-gas (Stewart & William Costerton, 2001a), también se encuentran embebidas en una matriz de Sustancias Poliméricas Extracelulares (SPE) que usualmente contiene polisacáridos extracelulares, lípidos y ácidos nucleicos (Claessen, Rozen, Kuipers, Sogaard-Andersen, & van Wezel, 2014).

El desarrollo de las biopelículas consta de tres procesos. El primer proceso es; la adherencia de bacterias que inician división celular extendiéndose sobre una superficie y secreta SPE para formar una matriz que las rodee dando una forma similar a cuerpos fructíferos, el segundo proceso es; la maduración de la biopelícula, donde crecerá hasta su tamaño óptimo dependiendo de los recursos o el estrés que condicione el medio y finalmente, la liberación o dispersión de la colonia generando el tercer proceso en donde será posible llegar a otras superficies para colonizar (Figura 1) (Donlan, 2001; Teresa Herrera Mendoza Bac Esp & Revisión, 2004).

El ambiente juega un papel importante en la formación de las biopelículas. Uno de los factores principales es estrés generado por el medio como; falta (Claessen et al., 2014; Costerton, 1999) o exceso de nutrientes (Delaquis, Caldwell, Lawrence, & McCurdy, 1989), cambios en la temperatura (Rachid, Ohlsen, Witte, Hacker, & Ziebuhr, 2000), el estrés oxidativo (Baker et al., 2010), daño en el ADN (Kuchma et al., 2007), y la presencia de antibióticos (Kaplan et al., 2012; Williams, Venables, Lloyd, Paul, & Critchley, 1997).

Figura 1. Formación y desarrollo de una biopelícula de *Pseudomonas sp.*



En la imagen se muestran los tres procesos que se llevan a cabo para la formación de una biopelícula. Estos son: Adhesión y desarrollo, maduración y dispersión de las biopelículas.

Estructura de las biopelículas

La resistencia a la depredación, a la deshidratación, y a los antibióticos se debe a la interacción de los componentes de la biopelícula, es decir a su estructura (Schmitt, Nivens, White, & Flemming, 1995). Esto se debe a los microambientes que esta genera dentro de las biopelículas, los que crean gradientes de disponibilidad de nutrientes y oxígeno, lo que lleva a cambios fisiológicos en la biopelícula (Drenkard, 2003).

La estructura de las biopelículas es el arreglo y las relaciones entre los componentes de la biopelícula. Los componentes de las biopelículas se pueden dividir en bióticos y abióticos, es decir, las bacterias que habitan en la biopelícula y los elementos abióticos que conforman la matriz, como, las SPE. Cada uno de estos componentes permite cualificar o cuantificar la estructura de las biopelículas.

La estructura de las biopelículas se determina de acuerdo a diferentes parámetros. Los parámetros más comúnmente utilizados para describir las biopelículas son; la diversidad de especies, la composición de la biopelícula, la cobertura y la densidad de micro colonias. Por lo tanto, la estructura de las biopelículas se considera como la relación entre estos parámetros.

La cualificación de los parámetros de una biopelícula se puede realizar por múltiples metodologías. La selección de la metodología utilizada depende del objetivo de la investigación, dentro de los métodos más comunes se encuentran; microscopía confocal láser para la estructura tridimensional de las biopelículas (Adams & McLean, 1999), microelectrodos para el estudio de sus microambientes (Yang & Lewandowski, 1995), inmunofluorescencia para el estudio de la expresión genética (Buswell, C.M.,

Herlihy, Y.M., Lawrence, L.M., Mcguiggan, J.T., Marsh, P.D., Keevil, C.W., Leach, 1998), y tinciones para conocer la cobertura y densidad de las biopelículas (Merritt & Qi, 2012) .

Modelos para el estudio de las biopelículas

Las biopelículas son sistemas complejos por lo que se emplean modelos que facilitan su estudio. Estos modelos utilizan bacterias que destacan por su continua aparición en ámbitos infecciosos u otros procesos de interés humano como facilidad de cultivo o características específicas de las bacterias. A continuación, describimos los modelos más comunes para el estudio de las biopelículas de bacterias Gram negativas y Gram positivas en los diferentes campos posibles.

Tabla 1. Modelos de bacterias para el estudio de biopelículas.	
Modelo (Bacteria)	Propósito de estudio
<i>Bacillus subtilis</i>	Regulación genética de la formación de biopelículas (Kearns, Chu, Branda, Kolter, & Losick, 2005) Análisis de las proteínas que componen la matriz de las biopelículas (Branda, Chu, Kearns, Losick, & Kolter, 2006).
<i>Escherichia coli</i>	Determinar la función de los exopolisacaridos en la formación de biopelículas (Danese, Pratt, Dove, & Kolter, 2000) Estudiar el efecto de la 7-hidroxiindol y la Isatina sobre biopelículas (Lee, Bansal, Jayaraman, Bentley, & Wood, 2007) Determinar la importancia de las adhesinas sobre la formación de biopelículas (Keren et al., 2004) Analizar el papel de los flagelos, pili, y ácido colánico sobre la formación de biopelículas (Prigent-Combaret et al., 2000) Determinar el efecto de la movilidad sobre la estructura de las biopelículas (Wood, González, Herzberg, & Lee, 2006) Analizar el papel de la comunicación intercelular en las biopelículas (Danese et al., 2000)

	Inactivar fotodinámicamente biopelículas usando verde de malaquita y fenotiazina (Hernández-Gómez et al., 2013)
<i>Haemophilus influenzae</i>	<p>Estudiar la formación de biopelículas de <i>H. influenzae</i> en epitelio de vías respiratorias de forma in vivo e in vitro (Starner, Zhang, Kim, Apicella, & McCray, 2006)</p> <p>Comparar las CMI's de estado planctónico y Biopelículas de ocho antibióticos de manera in vitro (Slinger et al., 2006)</p>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<p>Estudiar el efecto de la penetración de antibióticos sobre la resistencia a ampicilina y ciprofloxacino (Anderl, Franklin, & Stewart, 2000)</p> <p>Determinar el efecto del quorum sensing sobre la formación de biopelículas (Balestrino, Haagensen, Rich, & Forestier, 2005)</p> <p>Identificar los genes que regulan la formación de biopelículas (Boddicker, Anderson, Jagnow, & Clegg, 2006)</p> <p>Determinar el efecto de la ampicilina y el ciprofloxacino sobre la estructura celular de las bacterias en la biopelícula (Zahller, Zahller, Stewart, & Stewart, 2002)</p> <p>Analizar el efecto de una infección por bacteriófagos líticos sobre la resistencia a antibióticos de las biopelículas (Verma, Harjai, & Chhibber, 2010)</p>
<i>Pseudomonas spp.</i>	<p>Determinar la relación entre la variación fenotípica y la resistencia a antibióticos en biopelículas (Drenkard & Ausubel, 2002)</p> <p>Determinar la relación entre la exposición a macrólidos y la actividad enzimática en biopelículas (Mitsuya, Kawai, & Kobayashi, 2000)</p> <p>Analizar las vías genéticas que inician la formación de biopelículas (Toole & Kolter, 1998)</p> <p>Estudiar la plasticidad fenotípica durante el desarrollo de biopelículas (Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton, & Davies, 2002)</p>

	<p>Determinar el efecto de los surfactantes sobre la estructura de biopelículas(Davey, Caiazza, & Toole, 2003)</p> <p>Determinar la resistencia a la tobramicina de biopelículas formadas sobre catéteres (Nickel, Ruseska, Wright, & Costerton, 1985)</p>
<i>Vibrio cholerae</i>	<p>Determinar las condiciones ambientales que regulan la formación de biopelículas (Kierek, Kierek, Watnick, & Watnick, 2003)</p> <p>Determinar el efecto de osmoreguladores sobre la formación de biopelículas (Karatan, Duncan, & Watnick, 2005)</p> <p>Estudiar los genes involucrados en la resistencia al cloro de las biopelículas (Choolnik, 1999)</p> <p>Efecto de la movilidad por flagelos sobre la morfología de las biopelículas (Watnick, Lauriano, Klose, Croal, & Kolter, 2001)</p> <p>Determinar el efecto de las biopelículas sobre la resistencia a la depredación (Matz et al., 2005)</p>

La interacción entre las biopelículas y los antibióticos ha sido objeto de múltiples estudios. Estos se enfocan en estudiar el efecto de los antibióticos sobre las biopelículas basándose en los cambios que presenten su estructura, expresión genética y composición en condiciones ambientales. Al ser nuestro objetivo el análisis de la estructura se van a analizar la cobertura y la densidad de las biopelículas.

Antibióticos

La palabra antibiótico proviene del latín antibiosis. El primer concepto surgió en 1889 por Paul Vuillemin y decía que era la creatura que destruye la vida de otro para sustituirlo por la propia. Sin embargo, en 1947 se retoma este concepto por Waksman y lo describe como la acción de agentes químicos que son producidos por microorganismos, con la finalidad de acabar con la vida (Waksman, 1947).

Los antibióticos son fundamentales para el tratamiento y erradicación de enfermedades infecciosas generadas por microorganismos. Sin embargo, hay varias formas de clasificarlos una de ellas es por; bactericidas y bacteriostáticos. Los antibióticos bactericidas son aquellos que matan las bacterias con

una probabilidad de $\geq 99.9\%$ y los antibióticos bacteriostáticos inhiben el crecimiento de la comunidad bacteriana, pero no la mata lo que permite la continuación de la infección al término del tratamiento con antibiótico. Este efecto va a depender de la especie de bacteria en cuestión, el mecanismo de acción del antibiótico y la concentración del antibiótico. (Kohanski, Dwyer, Hayete, Lawrence, & Collins, 2007; Linares, Gustafsson, Baquero, & Martinez, 2006)

Otra de las clasificaciones es de acuerdo a su estructura molecular. El mecanismo de acción de los antibióticos se debe a su estructura, por lo que los antibióticos del mismo tipo tienen mecanismos de acción en común. En la tabla 2 mostramos la clasificación de los antibióticos, su mecanismo de acción, su estructura química básica, si son bactericidas o bacteriostáticos, y algunos ejemplos de cada antibiótico.

Tabla 2. Principales tipos de antibiótico y sus descripciones.					
Tipo de Antibiótico	Mecanismo de acción	Estructura química	Bacteriostático o bactericida	Ejemplos	Referencias
Betalactámicos	Inhiben la síntesis de la pared celular	Anillo betalactámico	Bactericidas	Penicilina, cefalosporinas, carbapenemas, monobactámicos y ácido clavulánico	(Marín & Gudiol, 2003; Suárez & Gudiol, 2009)
Glicopéptidos	Actúan sobre la pared bacteriana	Azúcares ligadas a aminoácidos	Bactericidas de espectro reducido	Vancomicina, teicoplanina	(Tenover, Biddle, & Lancaster, 2001)
Aminoglucósidos	Bloqueo de la síntesis proteica al unirse a la unidad 30 s del ribosoma	Tienen azúcar con grupo amino NH ₂	Bactericida de acción rápida	Streptomina, neomicina, gentamicina y kanamicina	(Marie-Paule, Glupczynski, & Tulkens, 1999)
Macrolidos	Bloqueo de la síntesis proteica al unirse a la unidad 50 s del ARN ribosómico	Anillo macro cíclico de lactona con 14 a 16 miembros	Bacteriostáticos	Eritromicina, claritromicina y azitromicina	(Roberts et al., 1999)
Quinolonas	Inhiben síntesis de ADN	Grupo fluoruro en el anillo central	Bactericidas	Ciprofloxacino, levofloxacino, ofloxacino.	(Park, Kim, & Bark, 2002)
Tetraciclinas	Inhiben síntesis proteica en subunidad 30s en el ribosoma	Anillo de naftaleno	Bacteriostático	Clortetraciclina y demetilclortetraciclina.	(Ian & Marilyn, 2001)

Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de interés mundial debido a que el 40 % de todos los pacientes hospitalizados requieren de tratamientos con algún tipo de antibiótico, (Cordiés Jackson L., Machado Reyes Looney A. & Cordiés, 2009) sin embargo, la problemática es una reacción en cadena donde las infecciones no son erradicadas, los pacientes permanecen por más tiempo hospitalizados, consumiendo más de los recursos estimados y a su vez se elevan los costos en sector salud (Hernández-Gómez et al., 2013). Por lo anterior el estudio de la resistencia a antibióticos es crítico para superar este problema.

Las bacterias tienen diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos. Algunas bacterias presentan más de un mecanismo (Nikaido, 1998). Algunos de estos mecanismos como las biopelículas pueden incrementar la resistencia de las bacterias a los antibióticos hasta 8 veces (Davies, 2003). Los mecanismos mejor descritos son; modificación enzimática del antibiótico, bombas eectoras de múltiples antibióticos, cambios en la permeabilidad, alteraciones en el blanco del antibiótico, y cambio del estado fisiológico bacteriano.

La modificación enzimática del antibiótico por acción bacteriana consiste en la producción de enzimas que modifican la estructura química del antibiótico eliminando su función (G. Becerra, Plascencia, Luévanos, Domínguez, & Hernández, 2009). Un ejemplo común es la producción de betalactamasas que modifican el anillo lactámico de las penicilinas (Anderl et al., 2000). Este mecanismo también se ha encontrado en las enterobacterias *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* las que producen betalactamasas del grupo III modificando la penicilina y la cefalosporina. Este puede encontrarse en conjunto con alteraciones del blanco del antibiótico y bombas eectoras de múltiples antibióticos (Vicente & Pérez-Trallero, 2010). Es posible contrarrestar este mecanismo con inhibidores de las enzimas degradadoras de antibiótico como el ácido clavulánico y el sulbactam en el caso de las betalactamasas (Cordiés Jackson L., Machado Reyes Looney A. & Cordiés, 2009).

Las bombas eectoras de múltiples antibióticos son proteínas transmembranales que transportan el antibiótico al exterior de la célula. Estas se encuentran en una gran cantidad de bacterias, por ejemplo, en *E. coli* donde proveen resistencia contra la tetraciclina (Vicente & Pérez-Trallero, 2010). También se observan en bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Bacteroides fragilis* con antibióticos como las Fluoroquinolonas (Nikaido, 1998).

Cambios en la permeabilidad de la membrana externa es un mecanismo de resistencia natural de manera usual y ocurre cuando el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana para alcanzar el núcleo celular (Vila, Martí, & Sánchez-Céspedes, 2007). Algunos ejemplos de este tipo de resistencia son las porinas existentes en *E. coli* y otras bacterias entéricas que impide el paso a antibióticos hidrófilos con un peso molecular de hasta 650 daltons (Bentley & Klebba, 1988; Holm, Björkstén, Gothefors, & Sande, 1980), la resistencia de los bacilos Gram negativos a la eritromicina, la clindamicina y la vancomicina, finalmente, la resistencia de los *Streptococos* y *P. aeruginosa* a los aminoglucósidos.

Alteraciones del blanco del antibiótico son modificaciones en la estructura o en el proceso metabólico de la bacteria. Por ejemplo, una mutación de la girasa de ADN, puede generar menor afinidad de las quinolonas por la citada enzima. Otro ejemplo es el cambio de las enzimas que sintetizan el ácido para-aminobenzoico, lo que da lugar a resistencias de sulfas y trimetoprima.

La resistencia a antibióticos también puede ser causada por el cambio del estado fisiológico bacteriano inducidos por la escasez de recursos como oxígeno (Drenkard, 2003; Walters, Roe, Bugnicourt, Franklin, & Stewart, 2003) o nutrientes (Wai, Mizunoe, Takade, Kawabata, & Yoshida, 1998). Tal es el caso de las bacterias viables, pero no cultivables en el cual se mantienen vivas, pero no es posible su cultivo en medios estándar porque requieren condiciones específicas cultivables (Oliver, 2010). También sucede en las bacterias en estado de inanición (Wu et al., 2005). Este proceso también ocurre en las biopelículas, sin embargo, esto será discutido posteriormente cuando se analiza la relación entre las biopelículas y la resistencia a antibióticos.

Relación entre las biopelículas y la resistencia a antibióticos

Las biopelículas juegan un papel importante, porque incrementan la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Por ejemplo; las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* incrementan cuatro órdenes de magnitud la resistencia de esta a la Carbenicilina (Spoering & Lewis, 2001). Las biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* son resistentes a algunos antibióticos como eritromicina, rifampicina y tetraciclina (Monzón, Oteiza, Leiva, Lamata, & Amorena, 2002).

El incremento de la resistencia a los antibióticos en las biopelículas se debe a los múltiples mecanismos de resistencia. Los mecanismos comúnmente descritos son; cambio de estado fisiológico, bombas efectoras de múltiples antibióticos, y cooperación interespecífica entre bacterias resistentes y susceptibles. Dichos mecanismos se encuentran detallados a continuación.

Las bacterias pueden encontrarse en múltiples estados fisiológicos, regulados por la expresión genética diferencial de la bacteria. Estos se encuentran fuertemente relacionados con la tasa metabólica bacteriana, y por lo tanto con la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Stewart & William Costerton, 2001a). Un ejemplo claro de estos es la dormancia la cual incrementa la resistencia de *Pseudomonas sp.* al ciprofloxacino (Brooun, Liu, & Lewis, 2000), otro ejemplo de cambio fisiológico se da al limitar el oxígeno en el medio, esto favorece un decremento en la tasa metabólica en biopelículas de *E. coli.* aumentando la resistencia antimicrobiana (Tresse, Jouenne, & Junter, 1995)

Las bombas efectoras de múltiples antibióticos son comúnmente expresadas en las biopelículas. Estas son transportadores transmembranales que activamente bombean al antibiótico fuera de la célula, lo que reduce la concentración de antibiótico intracelular con relación al medio (Webb et al., 2003). Estas bombas consumen una gran cantidad de energía ya que utilizan en gradiente de protones (Paulsen, Brown, & Skurray, 1996) o Na⁺ (Morita, Kataoka, Shiota, Mizushima, & Tsuchiya, 2000) que usualmente

es utilizado para la síntesis de ATP, pero su expresión en las biopelículas está regulada para que únicamente las bacterias de la superficie las expresen reduciendo el costo energético total para la población (Kievit et al., 2001).

La cooperación interespecífica entre bacterias resistentes y susceptibles requiere de proximidad espacial. Uno de los principales mecanismos de este tipo es la transferencia horizontal de genes de resistencia a los antibióticos. Otro mecanismo es la producción de enzimas degradadoras de antibióticos por uno de los miembros de la biopelícula reduciendo la concentración total del antibiótico para todas las bacterias.

Introducción

Las biopelículas son la forma de vida bacteriana predominante en la cual las bacterias se desarrollan en una interfase y producen una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Claessen et al., 2014; Stewart & William Costerton, 2001a). En las biopelículas las bacterias adquieren propiedades emergentes como la resistencia a antibióticos estas propiedades son generadas por la estructura de las biopelículas (Hall-Stoodley & Stoodley, 2005). Las biopelículas están presentes en un 60 % de las infecciones en humanos (Keren et al., 2004), y su tratamiento es usando antibióticos usualmente por lo que están constantemente expuestas a estos (Wu et al., 1995).

El efecto de las concentraciones inhibitorias de antibióticos sobre la estructura de biopelículas se ha estudiado en múltiples ocasiones (Gilbert, Das, & Foley, 1997; Keren et al., 2004; Olson, Ceri, Morck, Buret, & Read, 2002; Stewart & William Costerton, 2001b; Walters et al., 2003). No obstante, estas también pueden estar expuestas a concentraciones subinhibitorias, como cuando los pacientes no se apegan al tratamiento adecuado de un antibiótico (Yoh, Frimpong, Voravuthikunchai, & Honda, 1999). Hasta el momento el estudio del efecto de concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre la estructura de las biopelículas es limitado.

Por tal motivo el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino sobre la estructura de biopelículas. Para esto utilizamos como modelo experimental biopelículas de *Pseudomonas fluorescens*, y seleccionamos como antibiótico el ciprofloxacino por ser uno de los antibióticos más utilizados contra esta bacteria. Para estudiar la estructura determinamos la densidad y tamaño de las biopelículas en un área determinada. El tamaño es responsable de la resistencia a antibióticos a través de la generación de microambientes (McDougald, Rice, Barraud, Steinberg, & Kjelleberg, 2011). Por otro lado, la densidad de biopelículas nos permite determinar si estas se dispersan o permanecen. En conjunto nos permitió determinar el cambio en la estructura de las biopelículas bajo diferentes concentraciones de antibiótico.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto de concentraciones subinhibitorias de Ciprofloxacino sobre la estructura de las biopelículas de *P. fluorescens*?

Objetivo general

Determinar el efecto de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino sobre la estructura de biopelículas de *P. fluorescens*.

Objetivos particulares

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de ciprofloxacino para *P. fluorescens*.
- Cuantificar el cambio en la densidad y cobertura de las biopelículas de *P. fluorescens* después de la exposición a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino

Metodología

Mantenimiento y cultivo de *P. fluorescens*

Pseudomonas fluorescens fue obtenida de la colección del laboratorio de Ecología Microbiana, UBIPRO. Fue mantenida en cajas con agar King B a temperatura ambiente.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciprofloxacino sobre *P. fluorescens*. Se elaboró una curva de inhibición usando caldo nutritivo con las siguientes concentraciones de ciprofloxacino 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 y 0.25 µg/ml. La CMI para *P. fluorescens* fue de 0.5 µg/ml de ciprofloxacino.

Diseño experimental

Realizamos un diseño experimental por bloques, este consistió de 4 tratamientos con las siguientes concentraciones de ciprofloxacino; 0.25 µg/ml (alta) y 0.125 µg/ml (baja), 0.5 µg/m (inhibitoria) y 0 µg/ml, estas representan la concentración subinhibitorias baja, alta, la CMI en caldo y el control negativo respectivamente. De cada tratamiento se hicieron 3 repeticiones.

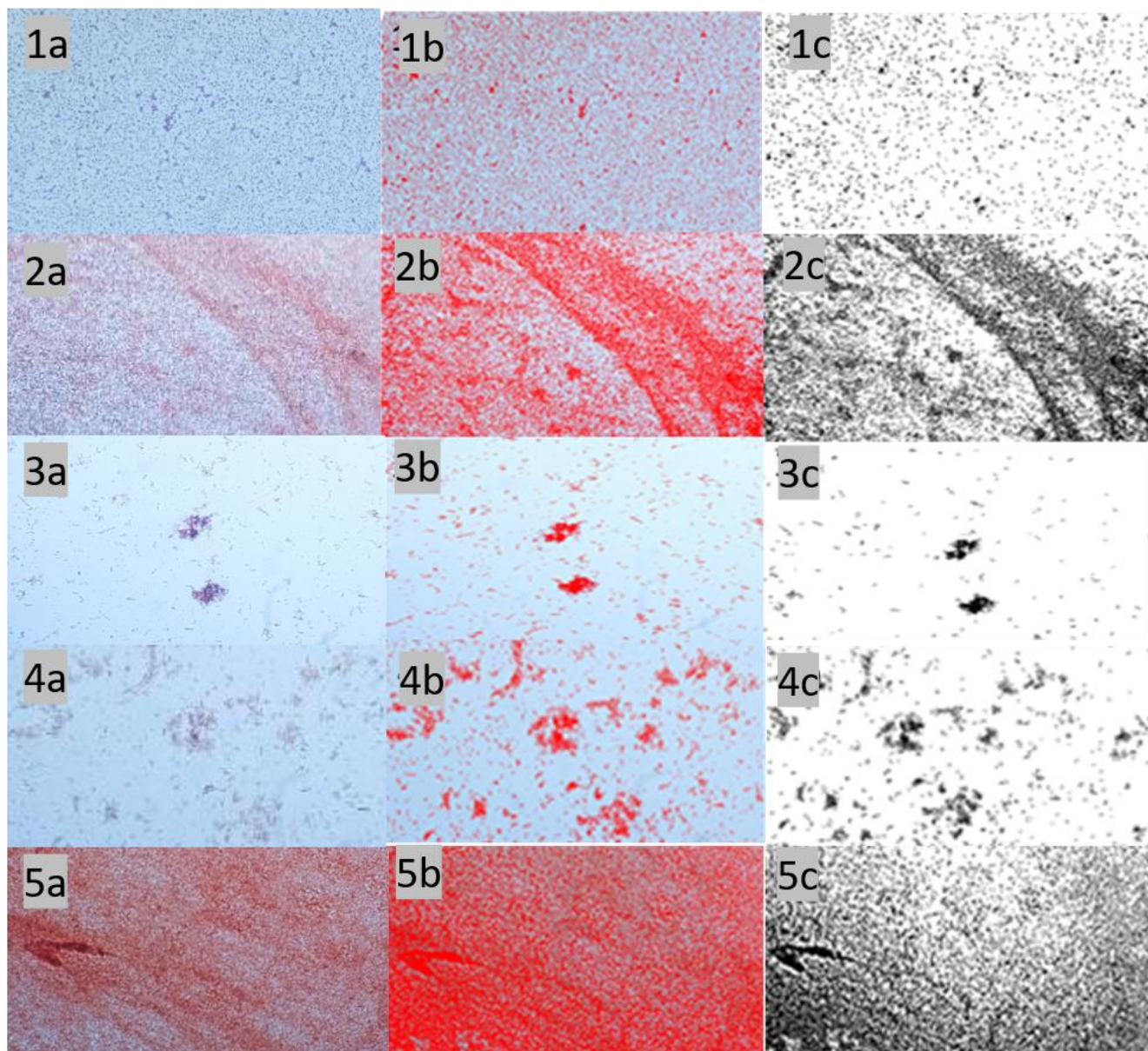
Determinación del efecto de concentraciones subinhibitorias sobre la estructura de Biopelículas

Para determinar el efecto de las concentraciones subinhibitorias sobre la estructura de las biopelículas de *P. fluorescens* indujimos la formación de estas sobre portaobjetos. Para esto colocamos portaobjetos en el fondo de cajas de Petri con un portaobjetos al fondo como superficie de adhesión. A esta se añadieron 15 ml de caldo nutritivo al 50 % previamente inoculado con *P. fluorescens* y se mantuvieron a temperatura ambiente, sin agitación por 72 horas. Después se agregó Ciprofloxacino para alcanzar las concentraciones de 0.25 µg/ml y 0.125 µg/ml, la CMI 0.5 µg/ml y un control negativo sin antibiótico y se dejaron por 48 horas más. Finalmente se tiñeron con safranina al 0.2 % y se observaron al microscopio óptico para ser fotografiadas y analizadas.

Análisis de la estructura de biopelículas

Para cuantificar la cobertura y densidad de las biopelículas se utilizó el programa Image J versión 1.51j8. Utilizando la herramienta *color threshold* generamos mascarar en blanco y negro de las biopelículas, la correspondencia entre la máscara y las biopelículas puede apreciarse en la figura 3. Las máscaras fueron analizadas usando la herramienta de cuenta de partículas para determinar la densidad de las biopelículas y el área de cada una de ellas, eliminamos todas las partículas menores a 2µm² ya que este es el tamaño mínimo de una biopelícula de *pseudomonas* sp. y cualquier partícula menor podría ser ruido.

Figura 3. Procesamiento de las imágenes para el análisis de la cobertura y densidad de las biopelículas de *P. fluorescens* en los diferentes tratamientos.



(A) Fotografía original; (B) fotografía con la máscara superpuesta; (C) Máscara.

(1) Biopelícula de 72 horas, (2, 3, 4 y 5) biopelículas bajo los tratamientos de 0.5, 0.25, 0.12, y 0.0 µg/ml de ciprofloxacino respectivamente.

Las biopelículas se clasificaron de acuerdo a su tamaño. Esta clasificación incluye 6 rangos y para formarlos asumimos que la biopelícula más pequeña tendría un área de entre 2 y 4 μm^2 y estaría compuesta por una sola bacteria adherida, las otras clases se formaron exponencialmente para representar el crecimiento que tendría la biopelícula asumiendo que esta creciera únicamente por división celular y no por el reclutamiento de bacterias planctónicas (Tabla 3).

Tabla 3. Definición de las clases de biopelículas de acuerdo al tamaño y número de bacterias.	
Tamaño de la biopelícula (μm^2)	Número de Bacterias por biopelícula
4	1-2
➤ 4 - < 8	4
➤ 8- < 16	8
➤ 16 - < 32	16
➤ 32 - < 64	32
➤ 64 – 128	64

Análisis estadístico

El número y tamaño de las biopelículas en cada tratamiento fueron analizados para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Primero realizamos una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov la cual resultó negativa, debido a que los datos no tienen una distribución normal por lo que realizamos un análisis de varianza de una vía por rangos de Kruskal-Wallis.

Resultados

Nos preguntamos cuál era el efecto de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino sobre la estructura de biopelículas de *P. fluorescens*. Para esto expusimos biopelículas de 3 días a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino (0.25 y 0.125 $\mu\text{g/ml}$) por 48 horas y determinamos el efecto sobre su estructura. En todos los tratamientos observamos la formación de múltiples biopelículas sobre el portaobjetos. Así mismo observamos una marcada disminución de cobertura total en las concentraciones subinhibitorias con relación a los otros tratamientos (figura 4). Lo que sugiere que las concentraciones tienen un efecto de dispersión o inhibición de las biopelículas.

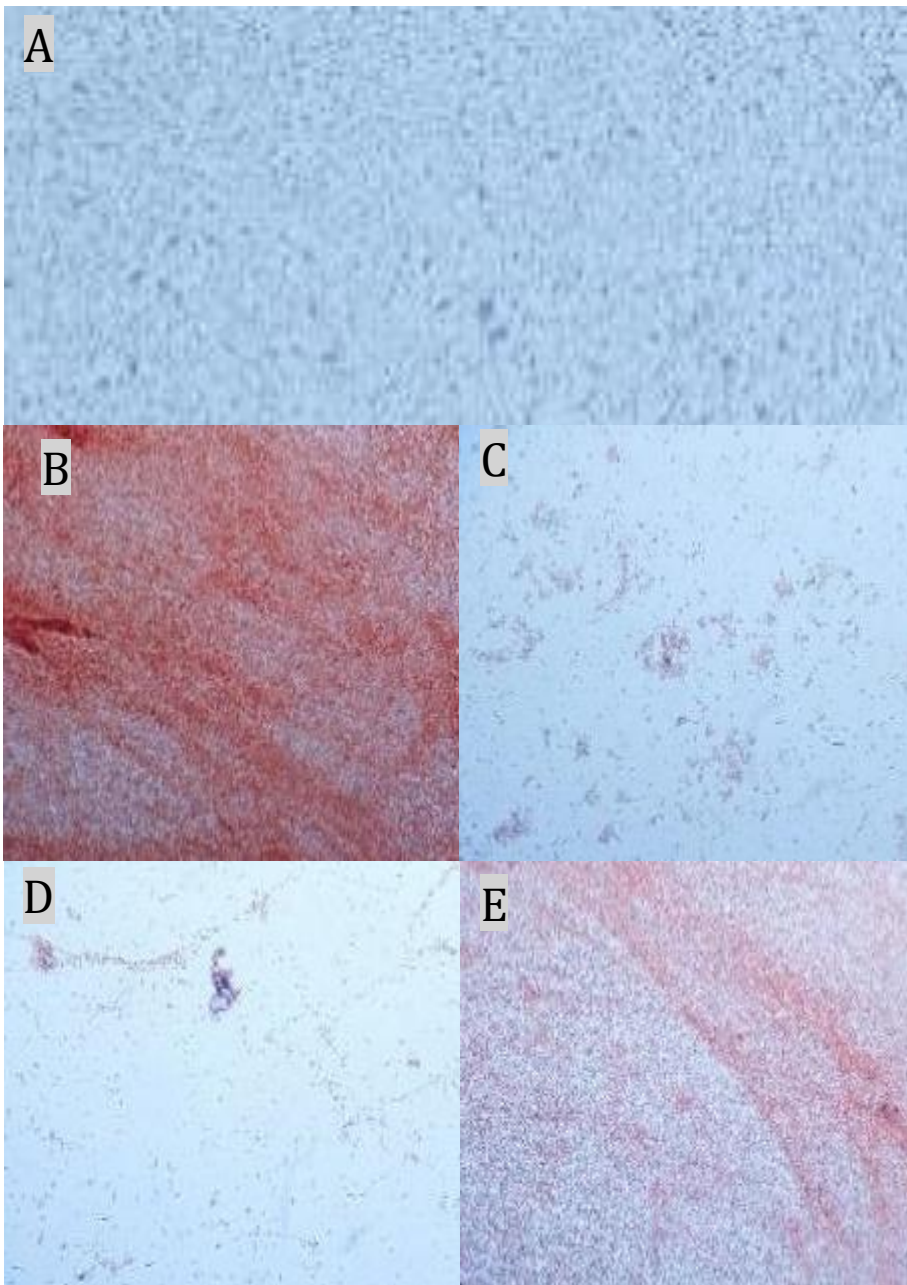
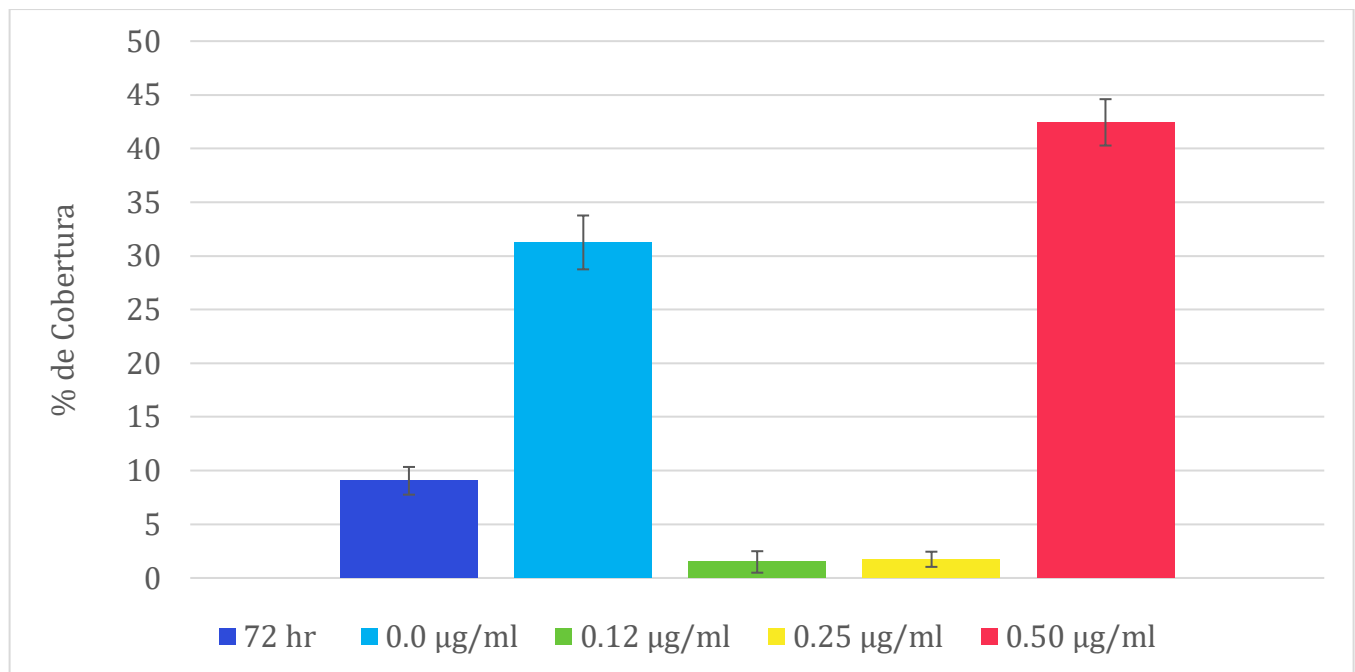


Figura 4: Estructura microscópica de las biopelículas maduras de *P. fluorescens* antes y después de su exposición a concentraciones subinhibitorias.

(A) Biopelícula de 72 horas, (B, C, D y E) biopelículas de 72 horas expuestas por 48 horas a 0.5, 0.25, 0.12, y 0.0 $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacino respectivamente.

La cobertura por las biopelículas varía significativamente entre los tratamientos y los grupos control ($H = 2056.77$, $P = <0.001$). La cobertura en la concentración subinhibitoria alta fue de 1.74 % del área total y en la concentración subinhibitoria baja fue de 1.49 %, mientras que en el grupo control sin antibiótico la cobertura fue del 31.25 %, esto representa una disminución en la cobertura del 94.43 % en la concentración subinhibitoria alta y del 95.23 % en la concentración subinhibitoria baja (Figura 5). Por lo que asumimos que la disminución no fue causada por la muerte de las bacterias ya que en el tratamiento con la CMI de ciprofloxacino encontramos un incremento de un orden de magnitud con el 42.43 % de cobertura total.

Figura 5. Cobertura total de las biopelículas de *P. fluorescens* expuestas a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino.



La cobertura total nos brinda información limitada sobre la estructura de las biopelículas, por lo que clasificamos a las biopelículas dentro de 6 clases de acuerdo a su tamaño (tabla 3) y determinamos la frecuencia de cada clase. Encontramos un decremento en todas las clases de biopelículas después de exponerlas a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino con relación al número inicial de biopelículas, por otro lado, en el grupo sin antibiótico y con 0.5 µg/ml encontramos un incremento en todas las clases con excepción de la clase inicial (Figura 6).

Figura 6. Efecto de la exposición de biopelículas de *P. fluorescens* maduras por 48 horas a diferentes concentraciones de ciprofloxacino.

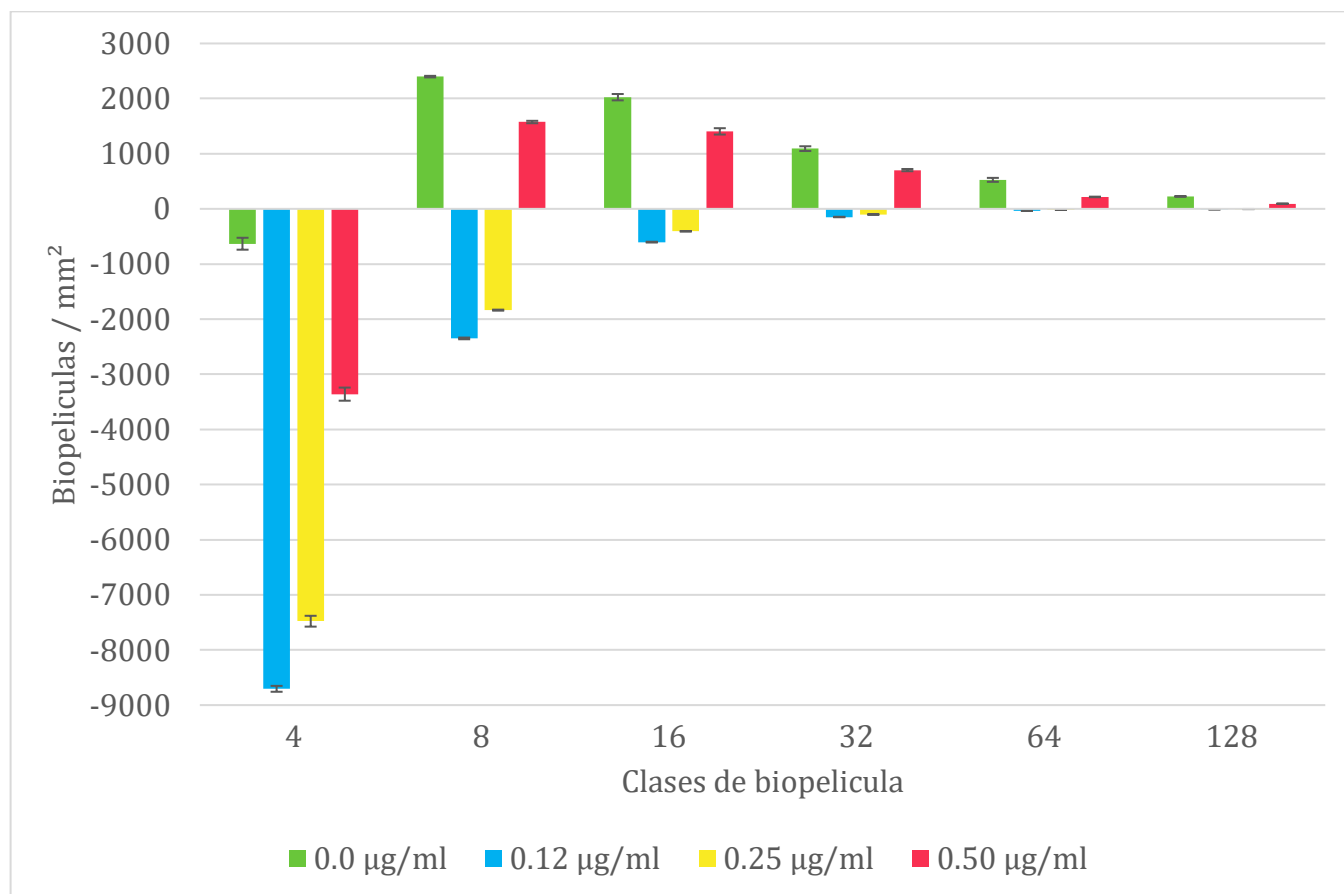
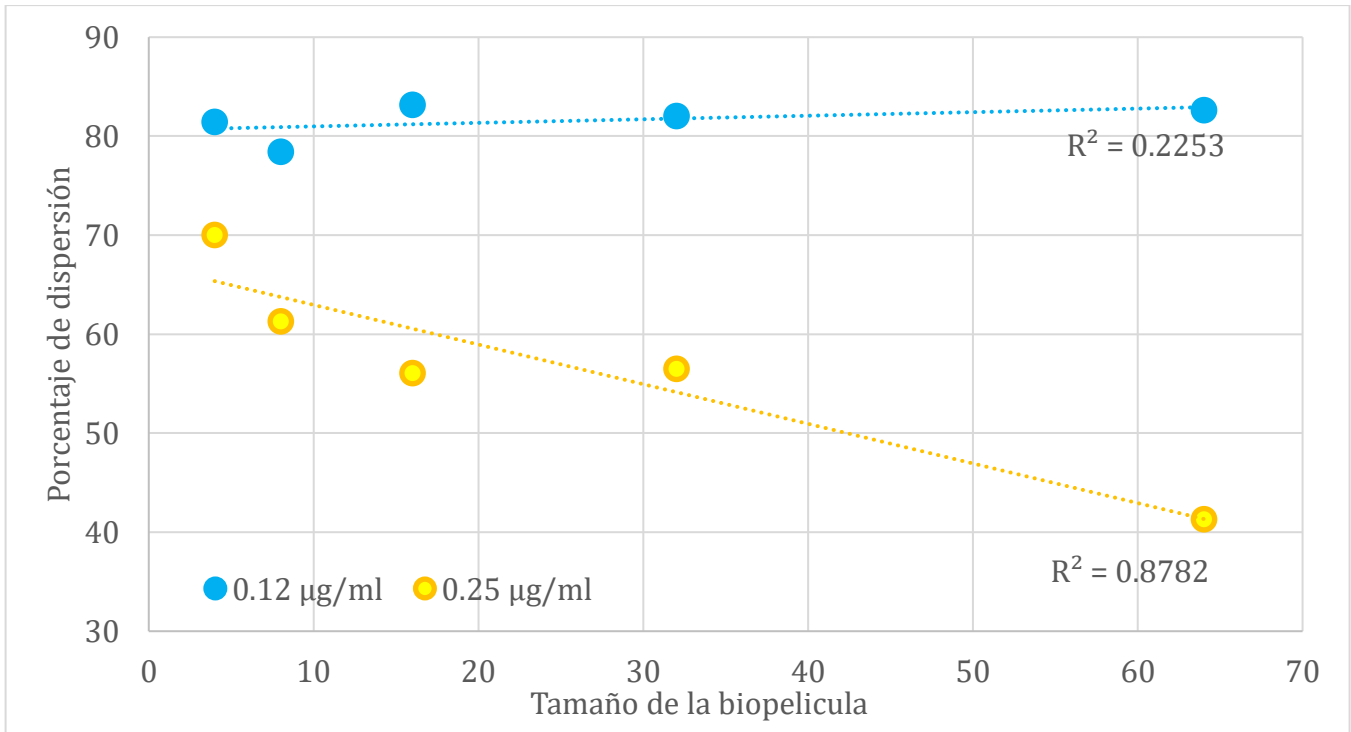


Figura 7. Relación entre el tamaño de las biopelículas y el porcentaje de dispersión de las biopelículas de *P. fluorescens* expuestas a concentraciones subinhibitorias de Ciprofloxacino.



La dispersión de las biopelículas depende de la concentración del antibiótico. Observamos dos tipos de respuesta; una independiente al tamaño causada por la concentración baja y otra dependiente del tamaño inducida por la concentración alta. En la independiente la dispersión es homogénea entre las diferentes clases, por otro lado, en la dependiente la dispersión es inversamente proporcional al tamaño de la biopelícula (Figura 7).

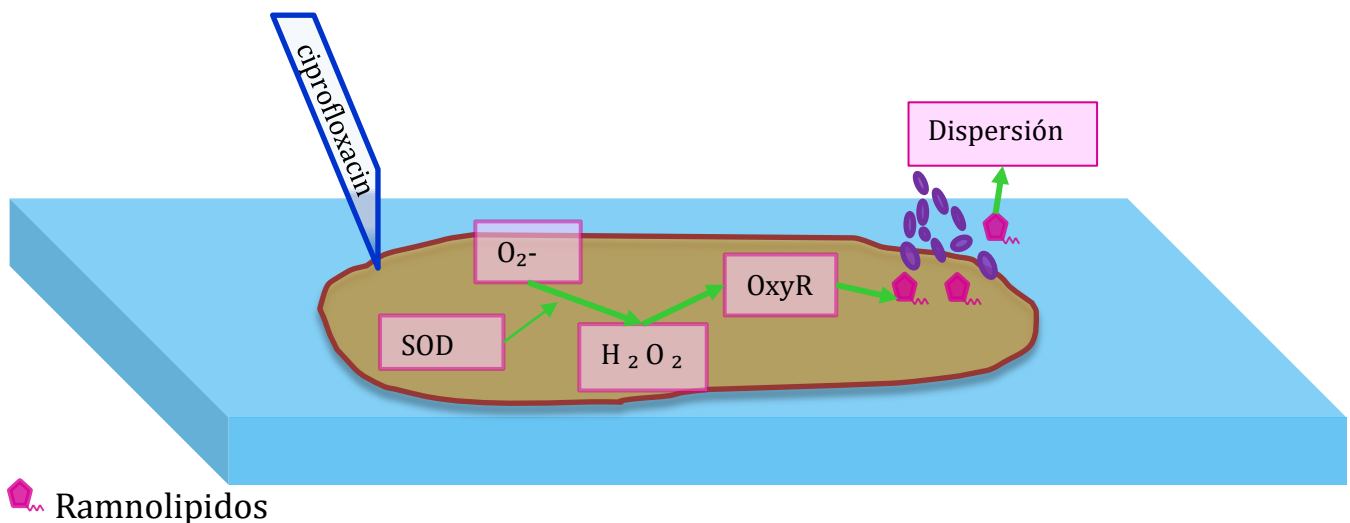
Discusión

Las biopelículas de *P. fluorescens* maduras se expusieron a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino por 48 horas. Al analizar la cobertura, la densidad y el tamaño de las biopelículas se encontró que la dispersión de las biopelículas de *Pseudomonas fluorescens* depende de las concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino y del tamaño de la biopelícula.

La respuesta de las biopelículas a las concentraciones subinhibitorias determina el cambio en su estructura y por lo tanto en sus propiedades emergentes. Encontramos dos tipos de respuesta a las concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino, una inversamente proporcional al tamaño de la biopelícula y una independiente a este factor. Esto sugiere que el ciprofloxacino tiene dos mecanismos diferentes de acción dependiendo de la concentración a la que se encuentre. Proponemos que en la concentración subinhibitoria alta (0.25 $\mu\text{g/ml}$) es dependiente de daño celular, mientras que en la concentración baja (0.12 $\mu\text{g/ml}$) interactúa con la señalización celular.

En la concentración subinhibitorias alta proponemos que el mecanismo de dispersión es disparado por daño celular. El mecanismo que planteamos inicia con la producción de radicales superóxido por el ciprofloxacino (M. C. Becerra & Albesa, 2002), estos radicales son transformados en H_2O_2 por la SOD (M. C. Becerra, Eraso, & Albesa, 2003), a su vez el H_2O_2 induce la expresión del factor de transcripción OxyR (Vinckx, Wei, Matthijs, & Cornelis, 2010), el que finalmente induce la síntesis de ramnolípidos (An, Wu, & Zhang, 2010), los que inducen dispersión de la biopelícula (Boles, Thoendel, & Singh, 2005). Esto explica porque las biopelículas más pequeñas, y más susceptibles a estrés oxidativo (Solano, Echeverz, & Lasa, 2014), son las que presentan mayor dispersión.

Figura 8. Mecanismo propuesto de dispersión inducido por concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino en biopelículas de *P. fluorescens*



El efecto de concentraciones subinhibitorias sobre las biopelículas también se ha estudiado en otras bacterias con resultados similares. Por ejemplo, la Vancomicina y cefamandol inducen dispersión en *Staphylococcus* sp. (Dunne, 1990), así como la Azitromicina en biopelículas de *Haemophilus influenzae* (Starner et al., 2008). No obstante también se ha observado la inducción de la formación de biopelículas por estas concentraciones, por ejemplo la Tetraciclina y la Quinupristina-dalfo en *S. epidermidis* 561 (Rachid et al., 2000), Meticilina, ampicilina, amoxicilina, y cloxacilina en *Staphylococcus aureus* (Kaplan et al., 2012), y la tobramicina en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Hoffman et al., 2005). Esto indica que la dispersión o formación de biopelículas depende de la naturaleza del antibiótico y de la especie bacteriana.

Las biopelículas usualmente están compuestas de una gran diversidad de especies de bacterias (Olson et al., 2002). Nuestro estudio utiliza un modelo de biopelícula mono especie lo que limita su aplicabilidad directa a casos de infecciones bacterianas. No obstante, el objetivo de este estudio es el funcionar como un punto de entrada para el estudio del efecto de concentraciones subinhibitorias sobre la estructura de biopelículas. Proponemos realizar más estudios considerando biopelículas multiespecie.

La dispersión por concentraciones subinhibitorias puede explicar las complicaciones generadas por tratamientos inconclusos de antibiótico. Ya que en estos tratamientos las bacterias están expuestas a concentraciones subinhibitorias lo que puede inducir su dispersión. Al dispersarse las bacterias buscan nuevos lugares donde establecerse y aumentan la superficie de infección (Claessen et al., 2014; Crespi, 2001; Hall-Stoodley & Stoodley, 2005). Adicionalmente existen dos factores más que contribuyen a esto; la aparición de variantes resistentes por el incremento en la tasa de mutación (Gillespie, Basu, Dickens, O'Sullivan, & McHugh, 2005), y el incremento en la producción de factores de virulencia (Yoh et al., 1999). No obstante, la dispersión inducida por antibióticos también podría aprovecharse como una estrategia para el tratamiento de infecciones por biopelículas. Esto debido a que cuando las biopelículas se dispersan, las bacterias de la biopelícula regresan al estado planctónico y estas se vuelven susceptibles a los antibióticos (Williams et al., 1997). Lo que proporciona nuevas oportunidades para combatir la infección bacteriana.

Conclusión

Nos preguntamos cual el efecto de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino sobre la estructura de las biopelículas. Encontramos que las concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino inducen la dispersión de biopelículas y propusimos que esto puede deberse a dos mecanismos diferentes, el primero en la concentración subinhibitoria alta (0.25 µg/ml) que es dependiente de daño celular y el segundo en la concentración baja (0.12 µg/ml) interactúa con la señalización celular. Proponemos corroborar estos dos posibles mecanismos en estudios posteriores.

Bibliografía citada

- Adams, J. L., & McLean, R. J. C. (1999). Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(9), 4285–4287.
- An, S., Wu, J., & Zhang, L. H. (2010). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-gmp phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(24), 8160–8173. <https://doi.org/10.1128/AEM.01233-10>
- Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(7), 1818–1824. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- Baker, J., Sitthisak, S., Sengupta, M., Johnson, M., Jayaswal, R. K., & Morrissey, J. A. (2010). Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formations. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(1), 150–160. <https://doi.org/10.1128/AEM.02268-09>
- Balestrino, D., Haagensen, J. a J., Rich, C., & Forestier, C. (2005). Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. *Society*, *187*(8), 2870–2880. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2870>
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, *29*(2), 70–76.
- Becerra, M. C., & Albesa, I. (2002). Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *297*(4), 1003–1007. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02331-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02331-8)
- Becerra, M. C., Eraso, A. J., & Albesa, I. (2003). Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdinin in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. *Luminescence*, *18*(6), 334–340. <https://doi.org/10.1002/bio.742>
- Bentley, A. T., & Klebba, P. E. (1988). Effect of lipopolysaccharide structure on reactivity of antiporin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface. *Journal of Bacteriology*, *170*(3), 1063–1068. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1063-1068.1988>
- Boddicker, J. D., Anderson, R. A., Jagnow, J., & Clegg, S. (2006). Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infection and Immunity*, *74*(8), 4590–4597. <https://doi.org/10.1128/IAI.00129-06>
- Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*, *57*(5), 1210–1223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04743.x>
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, *59*(4), 1229–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>
- Brooun, A., Liu, S., & Lewis, K. (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(3), 640–646. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.640-646.2000>
- Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Lawrence, L.M., Mcguiggan, J.T., Marsh, P.D., Keevil, C.W., Leach, S. A. (1998). Extended survival and persistence of *Campylobacter spp.* in water and aquatic biofilm and their detection by immunofluorescent antibody and rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(1), 733–745.

- Choolnik, G. A. R. Y. K. S. (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor : Identification of a gene cluster required for the rugose colony type , exopolysaccharide production , chlorine resistance , and biofilm formation, 96(March), 4028–4033.
- Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Sogaard-Andersen, L., & van Wezel, G. P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol*, 12(2), 115–124. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3178>
- Cordiés Jackson L., Machado Reyes Looney A., M. L. H., & Cordiés. (2009). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*, 8(1), 13–27.
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Crespi, B. J. (2001). The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(4), 178–183. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02115-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02115-2)
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L., & Kolter, R. (2000). The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 37(2), 424–432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02008.x>
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., & Toole, G. A. O. (2003). Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 †, 185(3), 1027–1036. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1027>
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Delaquis, P. J., Caldwell, D. E., Lawrence, J. R., & McCurdy, A. R. (1989). Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microbial Ecology*, 18(3), 199–210. <https://doi.org/10.1007/BF02075808>
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>
- Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, 5(13), 1213–1219. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>
- Drenkard, E., & Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416(6882), 740–743. <https://doi.org/10.1038/416740a>
- Dunne, W. M. (1990). Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(3), 390–393. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.3.390>
- Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 11(1), 160–167. <https://doi.org/10.1177/08959374970110010701>
- Gillespie, S. H., Basu, S., Dickens, A. L., O’Sullivan, D. M., & McHugh, T. D. (2005). Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 344–348. <https://doi.org/10.1093/jac/dki191>
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology*, 13(1), 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.004>
- Hernández-Gómez, C., Blanco, V. M., Mota, G., Correa, A., Maya, J. J., De la Cadena, E., ... Villegas, M. V. (2013). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*, 34(0), 91. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>
- Hoffman, L. R., D’Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005).

- Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>
- Holm, S. E., Björkstén, B., Gothefors, L., & Sande, M. (1980). Symposium on Host-Parasite Interactions: Umeå, Sweden, June 6–8, 1979. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 12(sup24), 1–227. <https://doi.org/10.3109/inf.1980.12.suppl-24.01>
- Ian, C., & Marilyn, R. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Mole*, 65(3), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232>
- Kaplan, J. B., Izano, E. A., Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L., ... Horswill, A. R. (2012). Low Levels of β -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio*, 3(4), 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00198-12>
- Karatan, E., Duncan, T. R., & Watnick, P. I. (2005). NspS, a Predicted Polyamine Sensor, Mediates Activation of *Vibrio cholerae* Biofilm Formation by Norspermidine. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7434–7443. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7434>
- Kearns, D. B., Chu, F., Branda, S. S., Kolter, R., & Losick, R. (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55(3), 739–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04440.x>
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., & Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00856-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00856-5)
- Kierek, K., Kierek, K., Watnick, P. I., & Watnick, P. I. (2003). Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5079–5088. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5079>
- Kievit, T. R. D. E., Parkins, M. D., Gillis, R. J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., ... Storey, D. G. (2001). An investigation of optimal power absorption as a noise control technique.pdf, 45(6), 1761–1770. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1761>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- Kuchma, S. L., Brothers, K. M., Merritt, J. H., Liberati, N. T., Ausubel, F. M., & O'Toole, G. A. (2007). BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8165–8178. <https://doi.org/10.1128/JB.00586-07>
- Lasa, P., Pozo, D., & De, R. (2016). Biofilms bacterianos e infeccion . [Bacterial biofilms and infection], 28, 1–2. Retrieved from https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=2&SID=N1mNs7HbrsDIEGNgzjF&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no
- Lee, J., Bansal, T., Jayaraman, A., Bentley, W. E., & Wood, T. K. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4100–4109. <https://doi.org/10.1128/AEM.00360-07>
- Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19484–19489. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0608949103>

- Marie-Paule, M.-L., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides : Activity and Resistance MINIREVIEW Aminoglycosides : Activity and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(4), 727–737. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89199/>
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), 42–55. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72873-0)
- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A. M., Yung, P. Y., Yildiz, F. H., & Kjelleberg, S. (2005). Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16819–16824. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505350102>
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- Merritt, J., & Qi, F. (2012). The mutacins of *Streptococcus mutans*: Regulation and ecology. *Molecular Oral Microbiology*, 27(2), 57–69. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00634.x>
- Mitsuya, Y., Kawai, S., & Kobayashi, H. (2000). Influence of macrolides on guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase activity in *Pseudomonas* biofilm. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s101560050049>
- Monzón, M., Oteiza, C., Leiva, J., Lamata, M., & Amorena, B. (2002). Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: Low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44(4), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00464-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00464-9)
- Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2000). NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6694–6697. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6694-6697.2000>
- Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., & Costerton, J. W. (1985). Tobramycin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Cells Growing as a Biofilm on Urinary Catheter Material, 27(4), 619–624.
- Nikaido, H. (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology*, 1(5), 516–523. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80083-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80083-0)
- Odenholt-Tornqvist, I., Lowdin, E., & Cars, O. (1991). Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1834–1839. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.9.1834>
- Odenholt, I. (2001). Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00243-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00243-0)
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Park, H.-R., Kim, T. H., & Bark, K.-M. (2002). Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37(6), 443–460. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01361-2](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01361-2)
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, 60(4), 575–608. <https://doi.org/PMC239457>
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: Role of flagella, curli and

- colanic acid. *Environmental Microbiology*, 2(4), 450–464. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x>
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., & Ziebuhr, W. (2000). Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3357–3363. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3357-3363.2000>
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, B., Rood, J., Seppala, H., ... Seppala, H. (1999). Nomenclature for Macrolide and Resistance Determinants MINIREVIEW Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide- Streptogramin B Resistance Determinants, 43(12), 2823–2830.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm, 184(4), 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1140>
- Schmitt, J., Nivens, D., White, D. C., & Flemming, H.-C. (1995). Changes of biofilm properties in response to sorbed substances - an FTIR-ATR study. *Water Science and Technology*, 32(8), 149–155. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00019-4](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00019-4)
- Slinger, R., Chan, F., Ferris, W., Yeung, S. W., St. Denis, M., Gaboury, I., & Aaron, S. D. (2006). Multiple combination antibiotic susceptibility testing of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56(3), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.04.012>
- Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>
- Spoering, A. M. Y. L., & Lewis, K. I. M. (2001). Biofilms and Planktonic Cells of. *Society*, 183(23), 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746>
- Starner, T. D., Shrout, J. D., Parsek, M. R., Appelbaum, P. C., & Kim, G. H. (2008). Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation and diminish established biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 137–145. <https://doi.org/10.1128/AAC.00607-07>
- Starner, T. D., Zhang, N., Kim, G. H., Apicella, M. A., & McCray, P. B. (2006). *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: Implications in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(2), 213–220. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1459OC>
- Stewart, P. S., & William Costerton, J. (2001a). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Stewart, P. S., & William Costerton, J. (2001b). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). *Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Tenover, F. C., Biddle, J. W., & Lancaster, M. V. (2001). Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 327–332. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010237>
- Teresa Herrera Mendoza Bac Esp, M., & Revisión, A. DE. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*, 2(2), 71–80.
- Toole, G. A. O., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple , convergent signalling pathways : a genetic analysis, 28, 449–461.

- Tresse, O., Jouenne, T., & Junter, G.-A. (1995). 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), 521–526. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/jac/36.3.521>
- Verma, V., Harjai, K., & Chhibber, S. (2010). Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*, 26(6), 729–737. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.511196>
- Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>
- Vila, J., Martí, S., & Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1210–1215. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl509>
- Vinckx, T., Wei, Q., Matthijs, S., & Cornelis, P. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: Protective role of pyocyanin. *Microbiology*, 156(3), 678–686. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031971-0>
- Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I., & Yoshida, S. I. (1998). *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3648–3655.
- Waksman, S. A. (1947). What is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*, 39(5), 565–569. <https://doi.org/10.1080/00275514.1947.12017635>
- Walters, M., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M., & Stewart, P. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317–323. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317>
- Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L., & Kolter, R. (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology*, 39(2), 223–235. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02195.x>
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., ... Charlton, T. (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 185(15), 4585–4592. <https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4585>
- Williams, I., Venables, W. A., Lloyd, D., Paul, F., & Critchley, I. (1997). The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 143(7), 2407–2413. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2407>
- Wood, T. K., González, A. F., Herzberg, M., & Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*, 361–367. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0263-8>
- Wu, Z., Yang, Y., Xie, L., Xia, G., Hu, J., Wang, S., & Zhang, R. (2005). Toxicity and distribution of tetrodotoxin-producing bacteria in puffer fish *Fugu rubripes* collected from the Bohai Sea of China. *Toxicon*, 46(4), 471–476. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2005.06.002>
- Yang, S., & Lewandowski, Z. (1995). Measurement of local mass transfer coefficient in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 48(6), 737–744. <https://doi.org/10.1002/bit.260480623>
- Yoh, M., Frimpong, E. K., Voravuthikunchai, S. P., & Honda, T. (1999). Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(9), 732–739. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10526400>
- Zahller, J., Zahller, J., Stewart, P. S., & Stewart, P. S. (2002). Transmission Electron Microscopic Study of

Antibiotic Action on. *Society*, 46(8), 2679–2683. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2679>