

***ESTUDIO DE ADAPTACIÓN BACTERIANA A CONCENTRACIONES
SUBINHIBITORIAS DE ANTIBIÓTICOS***

***STUDY OF BACTERIAL ADAPTATION TO SUB-INHIBITORY
CONCENTRATIONS OF ANTIBIOTICS***

Trabajo de Fin de Grado

ALICE SANTOLINI

Tutorizado por Guido Santos Rosales y Eduardo Pérez Roth

Grado en Biología
Julio 2021

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	3
<i>ABSTRACT</i>	3
<i>INTRODUCCIÓN</i>	4
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	5
CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	8
<i>OBJETIVOS</i>	10
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	11
1. DESCRIPCIÓN DEL MODELO BACTERIANO.....	11
2. PREPARACIÓN DE MEDIOS	11
3. MUESTRAS Y REPLICAS	12
4. MEDIDA DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO	14
<i>RESULTADOS</i>	14
<i>DISCUSIÓN</i>	21
<i>CONCLUSIONES</i>	26
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	27

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos, o resistencia a los antibióticos, es la capacidad de ciertas bacterias de sobrevivir y multiplicarse en presencia de uno o más antibióticos y, por tanto, seguir causando infecciones.

En la primera parte veremos cómo se comportan las bacterias en ausencia de antibióticos, generando lo que se denomina "curva de crecimiento sin antibiótico", que nos da una indicación de la tendencia de crecimiento de una población bacteriana.

Después de haber desarrollado esta curva y haber visto el crecimiento de las bacterias, cultivaremos las bacterias en presencia de antibióticos, la rifampicina, generando otra curva de crecimiento, pero esta sería con concentraciones diferentes del antibiótico rifampicina.

La curva de crecimiento de las bacterias sin antibiótico mostrará un crecimiento exponencial, pasando de una fase de latencia a una fase exponencial en la que las bacterias se desarrollan mucho y con velocidad máxima.

También veremos como crezcan las bacterias inoculadas en un medio en presencia del antibiótico. Se observará en particular que la bacteria tendrá un mayor crecimiento cuando el medio tenga bajas concentraciones de rifampicina; a altas concentraciones su desarrollo es limitado. Así, veremos que la rifampicina es capaz de contrarrestar los microorganismos cuando están presentes en cantidades elevadas, matándolos o impidiendo su proliferación.

ABSTRACT

Antibiotic resistance, or antibiotic resistance, is the ability of certain bacteria to survive and multiply in the presence of one or more antibiotics and thus continue to cause infections.

In the first part we will see how bacteria behave in the absence of antibiotics, generating what is called an "antibiotic-free growth curve", which gives an indication of the growth trend of a bacterial population.

After having developed this curve and having seen the growth of the bacteria, we will grow the bacteria in the presence of antibiotics, rifampicin, generating another growth curve, but this one would be with different concentrations of the antibiotic rifampicin.

The growth curve of the bacteria without antibiotics will show an exponential growth, going from a latent phase to an exponential phase in which the bacteria develop a lot and with maximum speed. We will also see how bacteria inoculated in a medium in the presence of antibiotic grow. In particular, it will be observed that the bacteria will have a higher growth when the medium has low

concentrations of rifampicin; at high concentrations their growth is limited. Thus, we will see that rifampicin is capable of counteracting micro-organisms when present in high quantities, killing them or preventing their proliferation.

INTRODUCCIÓN

El antibiótico, en el uso común actual, indica un fármaco, de origen natural (antibiótico en sentido estricto) o sintético (quimioterapéutico), capaz de frenar o detener la proliferación de las bacterias. Así, los antibióticos se dividen en bacteriostáticos (es decir, bloquean la reproducción de la bacteria, impidiendo que se desdoble) y bactericidas (es decir, matan directamente al microorganismo) (Laneve, 2019).

Los antibióticos se han utilizado con éxito en el tratamiento de la mayoría de las enfermedades infecciosas (a excepción de las virales) desde la década de 1950. Durante este período se han estudiado en detalle sus múltiples usos y mecanismos de acción, y existe una gran cantidad de información sobre la farmacología, la dosificación, los efectos secundarios, etc., asociados a sus aplicaciones clínicas. Las nuevas técnicas desarrolladas en los últimos años han permitido estudiar en profundidad el perfil de expresión génica de los antibióticos y otros inhibidores (Davies, Spiegelman, & Yim, 2006).

Al principio, los antibióticos se consideraban "medicamentos milagrosos", principalmente porque se introdujeron en una época en la que sólo se disponía de drenajes quirúrgicos o tratamientos espontáneos para tratar las infecciones bacterianas graves. Durante las cinco o seis décadas transcurridas desde su introducción, han aparecido varias clases de estos fármacos, como las sulfonamidas y la trimetoprima, las penicilinas, las cefalosporinas, el cloranfenicol, las tetraciclinas, las colimicinas, los macrólidos, las lincosamidas, las estreptograminas, las rifamicinas, los glucopéptidos, los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas, las oxazolidinonas, las glicilglicinas, los lipoglucopeptidos y las variaciones sobre estos temas. Desgraciadamente, por diversos mecanismos y tal vez como consecuencia de su uso profuso, muchos grupos bacterianos están mostrando resistencia a estos antibióticos (Zinner, 2007). En la actualidad, la mayoría de las infecciones bacterianas pueden seguir tratándose con los antibióticos disponibles utilizados solos o en combinación, pero cabe esperar un número creciente de fracasos clínicos con el armamento actual. La optimización de la dosis y la duración del fármaco podría ayudar a minimizar la aparición de resistencias en algunas situaciones.

Los antibióticos son, sin duda, los fármacos más potentes de la medicina, pero su mismo éxito amenaza con ser su perdición. El uso generalizado, y a menudo inadecuado, de los antibióticos en todo el mundo en los últimos años ha llevado a una situación en la que los patógenos bacterianos multirresistentes (MDRO), como las bacterias gramnegativas β -lactamas de espectro extendido (BLEE) y la tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB), son ahora una grave amenaza para la eficacia continuada de estos medicamentos (Andersson & Hughes, 2014).

Cuando los antibióticos se introdujeron por primera vez en la medicina hace unos 70 años, la metodología era relativamente sencilla: conseguir una dosis terapéutica en el lugar infectado lo suficientemente alta como para eliminar la infección bacteriana sin que tuviera un efecto tóxico grave en el paciente (Andersson & Hughes, 2014). Las primeras investigaciones sobre la susceptibilidad bacteriana y la dosificación de los antibióticos introdujeron uno de los conceptos centrales del campo: la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Andrews J. M., 2001), que se define como la menor concentración de fármaco que, en condiciones in vitro establecidas, inhibe el crecimiento visible de una población bacteriana objetivo.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La CMI es la menor concentración de antibiótico necesaria para impedir el crecimiento bacteriano (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009). Los métodos de CMI se utilizan en la observación de la resistencia, en los estudios epidemiológicos de susceptibilidad antimicrobiana in vitro realizados con microorganismos sospechosos de causar enfermedades, y contra agentes nuevos y existentes (ISO, 2019). Se mide en condiciones in vitro estandarizadas (es decir, un medio de crecimiento definido, el tamaño del inóculo, la temperatura y la duración de la incubación) utilizando dos pasos de dilución del fármaco y la posterior evaluación visual del crecimiento o no crecimiento bacteriano como resultado (Andersson & Hughes, 2014).

Algunas advertencias obvias sobre la utilidad de la CMI incluyen el hecho de que los valores determinados son relativamente imprecisos y pueden no traducirse fácilmente en una concentración efectiva in vivo (porque la CMI se mide en condiciones muy específicas in vitro) (Andersson & Hughes, 2014).

Una advertencia más seria es que la CMI mide sólo la concentración del fármaco que causa la inhibición completa del crecimiento bacteriano visible y no proporciona información sobre el rango de concentraciones del fármaco que, en diversos grados, reducen la tasa de crecimiento bacteriano y cambian la dinámica de selección dentro de una población (Andrews J. M., 2001).

La resistencia bacteriana a los fármacos está causada por la exposición a concentraciones de antibióticos por debajo de la CMI. Los informes sobre el impacto de las concentraciones mínima sub-inhedorias (sub-CMI) de los fármacos antibacterianos en las bacterias han sido contradictorios. Los informes recientes han demostrado que las sub-CMI de varios agentes antimicrobianos tienen efectos tanto inhibitorios como estimulantes en la formación de bio-películas de bacterias, como *E.coli*, en las infecciones humanas (Donga, et al., 2019). Las concentraciones de antibióticos sub-CMI permiten que las cepas susceptibles sigan creciendo, lo que a veces resulta en una tasa de crecimiento reducida en comparación con la tasa de crecimiento observada en ausencia del fármaco (Andersson & Hughes, 2014). El crecimiento continuo en presencia de niveles de antibióticos por debajo de la CMI es un aspecto crucial de la actual crisis de resistencia a los antibióticos, ya que estas concentraciones de fármacos se encuentran en muchos entornos naturales (como las aguas residuales y los lodos, los ríos, los lagos e incluso el agua potable), y también se dan en los pacientes y el ganado durante la terapia con antibióticos (Andersson & Hughes, 2014).

Y lo que es más importante, estudios recientes han demostrado que estas bajas concentraciones de antibióticos ejercen sus efectos en al menos tres niveles diferentes: como selectores de resistencia (enriqueciendo las bacterias resistentes preexistentes y seleccionando la resistencia de novo); como generadores de variabilidad genética y fenotípica (aumentando la tasa de evolución adaptativa, incluyendo el desarrollo de resistencia); y como moléculas de señalización (influyendo en varias actividades físicas, incluyendo la virulencia, la formación de biopelículas y la expresión genética). Así, los efectos de los niveles sub-inhedorios de antibióticos sobre las bacterias han sido reconocidos desde hace tiempo, especialmente en lo que se refiere a su acción a nivel de la superficie celular y sobre la morfología de las células objetivo; tanto es así que provocan numerosos cambios fenotípicos (Davies, Spiegelman, & Yim, The world of subinhibitory antibiotic concentrations, 2006). Esto se desprende claramente de varios estudios que demuestran que los niveles subrepticios de antibióticos aumentan la frecuencia de persistencia. Los *persisters* son variantes fenotípicas de crecimiento lento o sin crecimiento que surgen estocásticamente en poblaciones bacterianas susceptibles y son refractarias a múltiples antibióticos. Se cree que el estado de crecimiento lento o de no crecimiento de las bacterias persistentes, que es el resultado de una parada general de la actividad metabólica, es el responsable de su capacidad para sobrevivir a la exposición a los antibióticos (Andersson & Hughes, 2014).

La resistencia a los antibióticos es consecuencia de una inmensa plasticidad genética de los patógenos bacterianos que desencadenan respuestas específicas que dan lugar a adaptaciones mutacionales, adquisición de material genético o alteración de la expresión de los genes que producen resistencia a prácticamente todos los antibióticos disponibles actualmente en la práctica clínica (Munita & Arias, 2016). Este fenómeno se produce de forma continua y natural desde hace mil años: los antibióticos son producidos por bacterias y hongos que pertenecen a la naturaleza, con el objetivo principal de eliminar la competencia en un sistema ecológico definido.

Las bacterias que tienen contacto con estos antibióticos, desarrollan mecanismos de defensa para resistir su acción y así poder colonizar ambientes ricos en nutrientes con pocos competidores.

La resistencia se transmite a diferentes tipos de bacterias y éste es uno de los problemas más importantes. Las bacterias, de manera general, poseen 3 formas diferentes de resistencia a los antibióticos: a) alterar el objetivo del antibiótico, b) destruir el antibiótico y c) expulsar el antibiótico fuera de la célula (Munita & Arias, 2016). De forma general, estos mecanismos de resistencia pueden transmitirse tanto vertical como horizontalmente; bien pasando a las generaciones siguientes o bien pasando a otras bacterias de la misma o diferente especie.

Así que la resistencia a los antibióticos es un tipo particular de resistencia a los medicamentos antimicrobianos. Otros microorganismos, como los virus o los hongos, también son capaces de desarrollar resistencia contra los antimicrobianos (antivirales o antifúngicos) (Batteri Resistenti agli Antibiotici, 2018).

¿Cómo adquieren las bacterias resistencia a los antibióticos?

Hay muchas formas en las que las bacterias pueden adquirir resistencia a uno o más antibióticos. Uno de los principales factores es la presión selectiva (Batteri Resistenti agli Antibiotici, 2018) que es el acontecimiento desencadenado por el uso de antibióticos para tratar una infección causada por bacterias sensibles y resistentes a los medicamentos. De hecho, el uso del fármaco elimina las bacterias sensibles responsables de la infección (patógenas) y también las pertenecientes a la flora bacteriana residente normal, pero, si están presentes, no las bacterias patógenas resistentes (Batteri Resistenti agli Antibiotici, 2018). Estos últimos tienen así la oportunidad de crecer y expandirse. Aunque se trata de un proceso natural, la aparición de la resistencia a los antibióticos se ve favorecida por el uso frecuente de los mismos.

Las bacterias también pueden adquirir resistencia a los antibióticos mediante la transmisión horizontal (de una bacteria a otra) del material genético (Hinton-Sheley & B.Sc., 2019). Una de las formas en que esto puede ocurrir es a través de la transmisión de plásmidos. Se trata de pequeñas piezas circulares de ADN bacteriano que pueden transferirse fácilmente entre bacterias y que pueden llevar en su interior la información necesaria para producir enzimas que pueden conferir resistencia a determinados antibióticos.

Además, la mutación espontánea del material genético bacteriano puede dar lugar a la aparición de resistencias, que pueden transmitirse a las generaciones futuras (GALÁN, BAQUERO, MOROSINI, & BAQUERO, 2006). Por lo tanto, con el tiempo, las bacterias pueden adquirir una o más resistencias, generando las llamadas bacterias multi-resistentes (Multidrug-resistant bacteria, s.d.). Las bacterias resistentes a los antibióticos pueden propagarse entre persona a persona o entre personas y animales, incluidos los alimentos de origen animal, dando lugar a la propagación de infecciones que son difíciles o incluso imposibles de tratar (Antimicrobial resistance, 2020) .

CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Las curvas de crecimiento bacteriano son representaciones esenciales para caracterizar el metabolismo de las bacterias en una variedad de composiciones de medios. La información fenotípica cuantitativa puede integrarse fácilmente en las estructuras de datos actuales que describen un organismo bacteriano (Cuevas & Edwards, 2017).

Idealmente, los cultivos bacterianos crecen exponencialmente y la densidad óptica (DO) aumenta en función de $\log(DO)$, con el $\log(DO)$ se observa un crecimiento lineal. La tasa de crecimiento es el cambio en el número de células por minuto, que estimamos como el cambio en la DO por unidad de tiempo. Pero el cambio instantáneo es una función del número de células presentes en un momento dado. El crecimiento de los microorganismos se describe como un aumento de los constituyentes celulares que conduce a un aumento del tamaño de las células bacterianas, a un aumento del número de la población bacteriana o a ambos. Si un microorganismo aumenta de tamaño y no se divide se denomina cenocítico (Wikipedia, 2021). En este caso no hay un aumento numérico de la población. Si un microorganismo aumenta de tamaño y se divide, dando lugar a dos células hijas, el número de células de la población aumenta.

Por tanto, una curva de crecimiento permite identificar las diferentes fases de crecimiento y determinar el tiempo de generación del microorganismo en cuestión. Cada especie bacteriana tiene un rango de temperatura dentro del cual es capaz de crecer y reproducirse que viene determinado por la diferente sensibilidad de las enzimas y otros componentes celulares al calor y al frío; dentro de este rango existe entonces una temperatura óptima de crecimiento a la que los microorganismos se reproducen con el menor tiempo de generación

Se puede dividir en:

- Fase de latencia: es el periodo que tarda el microorganismo en adaptarse al medio;
- Fase de crecimiento exponencial: en la que el microorganismo se multiplica rápidamente;
- Fase estacionaria: en la que el microorganismo detiene su crecimiento porque se han agotado uno o varios nutrientes;
- Fase de declive: en la que el número de microorganismos comienza a disminuir a medida que las células muertas empiezan a superar a las que se dividen o están inactivas (Minniti, 2020).

A una fase de retardo en la que el crecimiento está ausente le sigue una fase de aceleración durante la cual la tasa de crecimiento aumenta hasta alcanzar una tasa de crecimiento estable durante la fase exponencial. Finalmente, la tasa de crecimiento comienza a disminuir durante la fase de desaceleración y finalmente el crecimiento cesa debido al agotamiento de los recursos y/o la acumulación de residuos durante la fase de saturación.

La duración de la fase de retardo y la forma de la curva durante la fase de aceleración dependen del estado fisiológico de las células del inóculo, de la fracción de células viables en el inóculo y del manejo de los cultivos del inóculo. Especialmente si se quiere controlar e interpretar la duración de la fase de retardo, es importante que los cultivos de inóculo crezcan de forma constante. Los inóculos deben cultivarse a la misma temperatura a la que se medirá la tasa de crecimiento. Las disminuciones en la tasa de crecimiento estimada pueden ser el resultado de una disminución real de la tasa o de la no linealidad de la DO en relación con el número de células a DO más altas (Hall, Acar, Nandipati, & Barlow, 2014).

El antibiótico que se va a utilizar será la rifampicina. Este medicamento es un antibiótico de rifampicina utilizado para prevenir y tratar la tuberculosis y otras infecciones. No funciona para las infecciones virales (como el resfriado común, la gripe) (Rifampin, s.d.). La rifampicina también se utiliza a veces para tratar infecciones causadas por otros tipos de bacterias y para prevenir la

infección en personas que han estado en estrecho contacto con una persona que tiene ciertas infecciones bacterianas graves (Rifampin, 2019).

El objetivo es ver cómo reaccionan las bacterias *E.coli* tanto en ausencia de rifampicina como en presencia de rifampicina. En particular, inocularemos las bacterias en diferentes medios que contendrán diferentes concentraciones de rifampicina, para ver cómo reaccionan las bacterias a estas concentraciones.

Además, crearemos bacterias definidas como adaptadas, es decir, adaptadas a un medio con el antibiótico, concretamente se inoculará en un medio a la mitad de la CMI. Cuando hablamos de bacterias adaptadas nos referimos a microorganismos que tienen la capacidad de cambiar sus procesos metabólicos, fisiológicos y de comportamiento, lo que les permite adaptarse a las condiciones del entorno en el que viven (Adaptación biológica, 2020). A continuación, estas bacterias se compararán con las no adaptadas. Ambos tipos de bacterias se inocularán en un medio con doble de la CMI y en un medio sin rifampicina, y el resultado que esperamos será más crecimiento en las bacterias adaptadas en comparación con las bacterias no adaptadas, ya que las bacterias adaptadas ya han tenido la oportunidad de crecer en un medio con antibiótico y, por tanto, ser capaces de reaccionar y adaptarse a él. Además, se verá si las bacterias cultivadas en el medio con CMI crecen más que las cultivadas en un medio sin el antibiótico.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Ver el efecto de concentraciones sub-CMI en el crecimiento de las bacterias *E.coli* en el medio a distintas concentraciones de rifampicina, especialmente a valor de CMI, al doble de CMI ($CMI \times 2$), a mitad de CMI ($CMI \times 0,5$) y sin rifampicina (NO CMI).
2. Ver cómo reaccionan las bacterias en el medio sin antibiótico, calculando su tasa de crecimiento en 24 horas.
3. Ver la diferencia entre las bacterias adaptadas a los antibióticos, que han sido inoculadas en un medio que tiene la mitad de CMI, y las bacterias no adaptadas, es decir, las bacterias *E.coli* no inoculadas en un medio en presencia del antibiótico, caracterizadas por tanto por sus condiciones naturales. Esa diferencia será visible cuando crezcan en un medio con el doble de la CMI o en un medio sin rifampicina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DESCRIPCIÓN DEL MODELO BACTERIANO

El modelo bacteriano que se ha utilizado es: *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo que es un organismo causante de muchas enfermedades, como la diarrea del viajero, la disentería, la neumonía, la bacteriemia y las infecciones abdominales. Las enfermedades causadas por *E. coli* suponen una carga importante para los pacientes y el sistema sanitario, por lo que es necesario un reconocimiento rápido y un tratamiento adecuado (Mueller & Tainter, *Escherichia Coli*, 2020).

2. PREPARACIÓN DE MEDIOS

El antibiótico que se utilizó es la rifampicina, un antibiótico bactericida del grupo de las rifamicinas. Se utiliza para tratar la tuberculosis, la lepra y la legionela (Alejandra Rodríguez-Verdugo B. S., 2013). Para evaluar el nivel de resistencia de *Escherichia coli* (el patógeno que se utilizará) al antibiótico, se utilizó la CMI de la rifampicina, que tiene un valor de 2,5 mg/L (Alejandra Rodríguez-Verdugo B. S., Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress, 2013). El valor de la CMI fue útil para crear los distintos medios a diferentes números de veces la CMI: concretamente, se crearon medios al valor de CMI (CMI), al doble de la CMI (CMIx2) y, finalmente, a la mitad de la CMI (CMIx0,5). Esto nos permitió ver cómo reaccionaban las bacterias a estas diferentes concentraciones y estimar la tasa de crecimiento en estas concentraciones.

El stock de rifampicina que se preparó a partir del producto puro (ya presente en el laboratorio) era de 50 mg/ml.

Por lo que los medios creados fueron de cuatro tipos: medio sólido con TSA con agar 40gr/L, el medio consistía en Digestión de Papaína de Soja 5,0 gr/L, Digestión pancreática de la Caseína 15,0 gr/L, Cloruro de Sodio 5,0 gr/L y Agar 15,0 gr/L.

El medio líquido consistía en TSB 30gr/L que consistía en Digestión pancreática de la Caseína 17 gr/L, Péptido de Soja Digest 3,0 gr/L, Glucosa (Dextrosa) 2,5 gr/L, Cloruro de sodio 5,0 gr/L y Fosfato Dipotásico 2,5 gr/L.

El medio líquido TSB con la concentración doble de la CMI (CMIx2) y al final el medio líquido TSB con la mitad de la CMI (CMIx0,5).

El medio sólido gracias a sus propiedades nutricionales (ya que es muy rico en

nutrientes), a la ausencia de inhibidores y a la posibilidad de ser complementado con varios otros compuestos, se utiliza a menudo para el aislamiento de patógenos, para el estudio de microorganismos de crecimiento rápido, para el mantenimiento de cepas de colección y para procesos de fermentación. Mientras que el medio líquido es un medio de cultivo utilizado generalmente como líquido de enriquecimiento en la mayoría de los laboratorios de microbiología para el crecimiento de microorganismos aeróbicos. En microbiología clínica también puede utilizarse para la suspensión, el enriquecimiento y el crecimiento de cepas previamente aisladas con otros medios de cultivo más selectivos. (Tryptic soy broth, 2015) (Tryptic Soy Agar, 2019).

Los antibióticos se esterilizaron por filtración en autoclave 1 hora a 121°C.

3. MUESTRAS Y REPLICAS

La preparación de las muestras se realizó con bacterias *E.coli* y medio líquido TSB.

Se creó una primera muestra, definida como muestra de referencia, con 100 µl de bacterias *E.coli* en 20 ml de TSB a 30 °C durante 24 horas. Después de 24 horas, esta muestra se midió con un espectrofotómetro a una absorbencia de 600 nm. La importancia de esta muestra patrón la encontraremos más adelante para la formación de 3 muestras, que denominamos TSB1, TSB2 y TSB3, útiles para la curva de crecimiento de las bacterias sin antibiótico, ya que era necesario establecer un valor que se identificara como medida de densidad óptica a partir del cual se tomara un volumen de bacterias para iniciar el cultivo y así asegurar que todos comenzaran con la misma cantidad de bacterias. El valor de absorbencia a 600 nm fue de 0,755.

3.1 Curva de crecimiento de las bacterias sin antibiótico

Las 3 muestras (TSB1, TSB2, TSB3), importante para crear la curva de bacterias sin antibiótico, se midieron cada 3 horas hasta 9 horas y media después del inicio del cultivo.

Todas las muestras se formaron utilizando el mismo procedimiento: se ha aplicado una dilución de 100 µl en 20 ml de TSB a 30°C.

3.2 Curva de crecimiento de las bacterias en presencia de antibiótico

Una vez que terminé la formación de las 3 muestras (TSB1, TSB2, TSB3), pasamos a la formación de 4 nuevas muestras con 2 réplicas cada una que sirvieron para la formación de la curva de crecimiento de las bacterias con el antibiótico.

Para formarlas se utilizaron los 4 medios que se habían formado previamente (TSB CMIx0,5, TSB CMIx2, TSB CMI y TSB sin CMI) esto es porque el propósito era cultivar bacterias en medios diferentes entre sí y luego compararlas. Cada muestra y replica tenía que haber al final 20 ml de volumen final.

Se utilizó, para crear estas 4 muestras con cada replica, un matraz que contenía 70 ml de TSB y 7 µl de rifampicina. De esta cantidad, se tomaron 10 ml para crear la muestra a valor de CMI; 5 ml para la muestra a CMIx0,5; ningún ml para la muestra NO CMI; el resto se dividió en la muestra a CMIx2. La medición de cada una de estas muestras con diferentes concentraciones de rifampicina se realizó en un día.

Inicialmente, cada muestra y sus respectivas réplicas se midieron cada 3 horas desde el inicio del crecimiento, para desarrollarse, adaptarse al medio y superar la fase de latencia.

Una vez superada esta fase, las bacterias, presentes en cada muestra y réplica, ya no se midieron cada 3 horas, sino que el intervalo de tiempo se redujo a 1 hora, para resaltar el crecimiento exponencial que se producía con relativa rapidez.

La formación de las dos curvas de crecimiento de las bacterias, en presencia y en ausencia del antibiótico, era necesaria para ver cómo se relacionaban las bacterias *E.coli* en medios diferentes, es decir, en un medio sin rifampicina y en un medio con rifampicina a diferentes concentraciones.

3.3 Comparación entre bacterias *E.coli* control y bacterias adaptadas

Por último, para evaluar aún mejor el comportamiento de las bacterias, se crearon 2 poblaciones bacterianas que creas para crecer en dos condiciones de cultivo: la primera población bacteriana en la que se aplicó una dilución de 100 µl de bacterias adaptadas al antibiótico en 20 ml de TSB CMIx0,5; la segunda población bacteriana en la que se aplicó una dilución de 100 µl de bacterias de control *E.coli* en 20 ml de TSB.

3.3.1 Bacterias adaptadas *E.coli*

Adaptamos la bacteria *E.coli* a un medio TSB que contenía la mitad de la concentración de rifampicina (TSB CMIx0,5). Esto sirvió para permitir la comparación entre estas bacterias y las bacterias *E.coli* no adaptadas con el fin de evaluar su desarrollo en dos medios diferentes: en el medio con doble de CMI (TSB CMIx2) y en el medio sin rifampicina (TSB NO CMI).

A partir de las 2 muestras [3.3] se formaron 4 muestras con 3 réplicas cada una; en particular en 2 muestras se había aplicado una dilución de 100 µl de la muestra que tenía las bacterias adaptadas en 20 ml de TSB CMIx2, y también en las respectivas 3 réplicas. En las otras 2 muestras restantes se aplicó una dilución de 100 µl de la muestra que tenía *E.coli* en 20 ml de TSB y en las 3 réplicas restantes.

Se trataba de ver si las bacterias adaptadas, que crecían en un medio con el doble de concentración de la CMI, crecían más que las bacterias *E.coli* de control, que también crecían en un medio con el doble de concentración de la CMI. Esto, si ocurría, significaba que las bacterias con el antibiótico ya se habían adaptado al antibiótico, al medio que lo contenía y eran resistentes.

4. MEDIDA DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

Una vez creados las 3 muestras (TSB1, TSB2 y TSB3) y las 4 muestras con dos replicas cada una (TSB CMIx0,5, TSB CMIx2, TSB CMI y TSB sin CMI) se crearon las dos curvas de crecimiento de las bacterias y se compararon para entender el comportamiento de las bacterias y discutir su resistencia o no al antibiótico rifampicina.

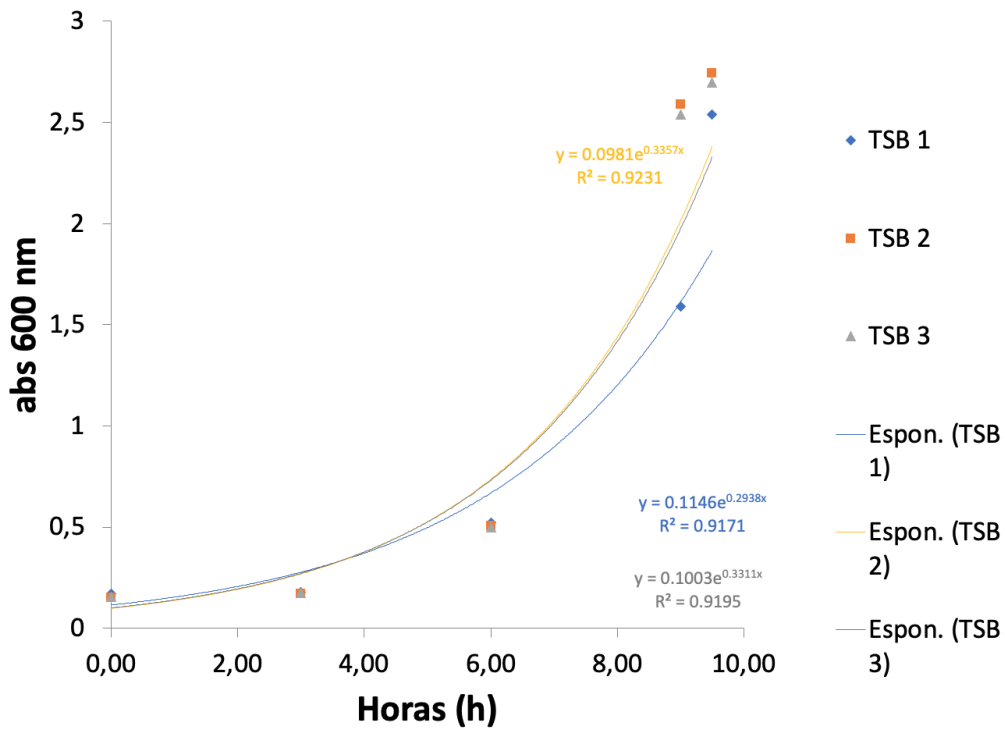
En la primera curva de crecimiento de las bacterias sin antibiótico, se utilizaron muestras de TSB1, TSB2 y TSB3; mientras que, en la segunda curva, en presencia de la rifampicina en diferentes concentraciones, se utilizaron muestras de TSB CMIx0,5, TSB CMIx2, TSB CMI y TSB sin CMI.

Esta última curva me permitió ver la tasa de crecimiento de las bacterias bajo diferentes condiciones para poder ver cómo se comportan las bacterias en un medio con el antibiótico, si son resistentes a diferentes condiciones de CMI o ver cómo reaccionan a las condiciones mencionadas anteriormente.

RESULTADOS

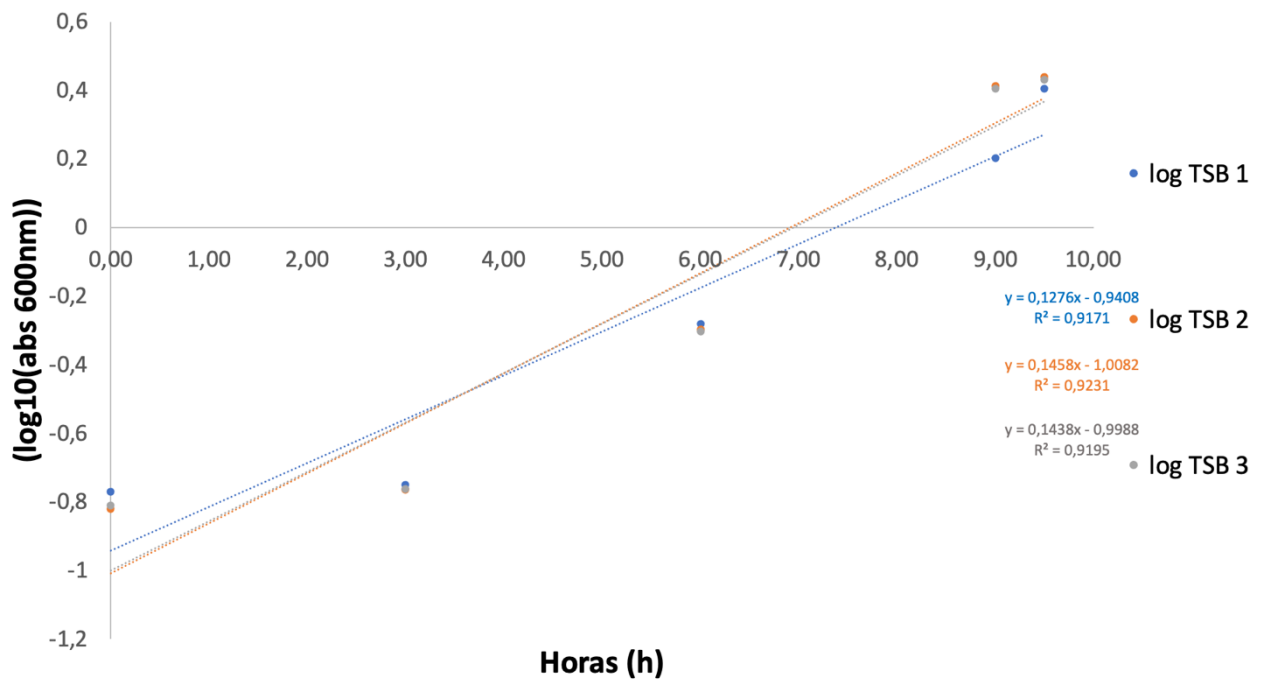
Curva de crecimiento de las bacterias sin antibiótico:

Horas	TSB 1 abs 600 nm	TSB 2 abs 600 nm	TSB 3 abs 600 nm
0,00	0,170	0,151	0,155
3,00	0,177	0,172	0,173
6,00	0,523	0,504	0,497
9,00	1,590	2,588	2,540
9,50	2,540	2,744	2,696



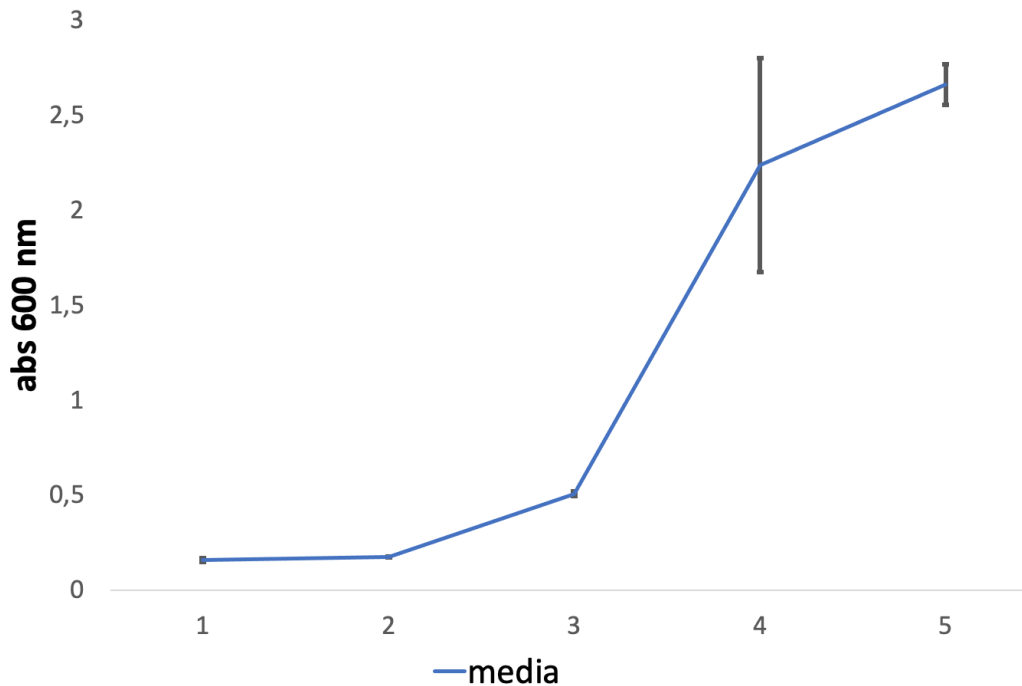
a)

Horas	Log TSB1 log ₁₀ (abs) 600 nm	Log TSB2 log ₁₀ (abs) 600 nm	Log TSB3 log ₁₀ (abs) 600 nm
0,00	-0,769	-0,821	-0,809
3,00	-0,750	-0,764	-0,762
6,00	-0,281	-0,297	-0,303
9,00	0,201	0,413	0,404
9,50	0,404	0,438	0,430



b)

Horas	Media abs 600 nm	Desviación típica abs 600 nm
0,00	0,158	0,010
3,00	0,174	0,002
6,00	0,508	0,013
9,00	2,239	0,562
9,50	2,660	0,106



c)

Fig.1 (a) Curva de crecimiento de las bacterias sin antibiótico en un tiempo de 9 horas y medio. Están representadas los valores de absorbancia de tres muestras (TSB 1, TSB 2, TSB 3) de bacterias *E.coli*. frente al periodo de tiempo en el cual se realizó el estudio.

(b) Curva de crecimiento de las tres muestras con valores de logaritmo frente al tiempo en el cual se realizó el estudio. El crecimiento se muestra a través de rectas de regresión.

(c) Medias de las tres muestras y sus desviaciones típicas están representadas a través de barras de error.

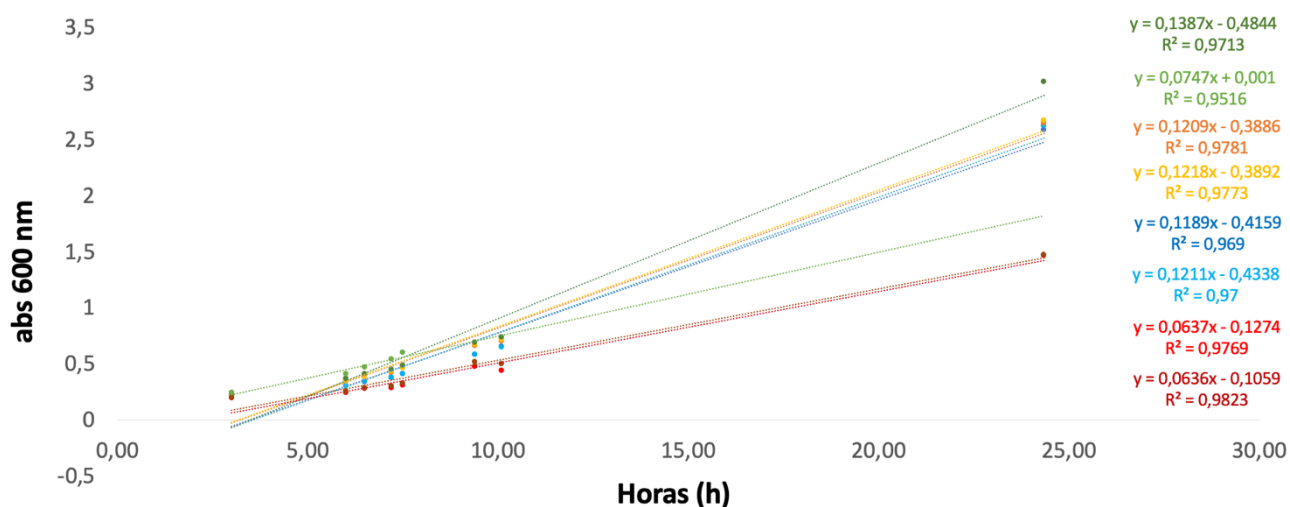
En la Figura 1a podemos ver que las bacterias de las muestras TSB 2 y TSB 3 alcanzan valores de crecimiento más altos que la muestra TSB 1 a partir de las 9 horas, presentando también una mayor tasa de crecimiento.

En la Figura 1b la curva de crecimiento presenta valores en forma logarítmica con respecto al tiempo. Podemos ver que hay una correlación linear (el cuyo valor es de 0,9999) con lo que dijimos antes respecto al hecho de que las muestras TSB 2 y TSB 3 muestran valores logarítmicos más altos que la muestra TSB 1 y además casi iguales entre sí. Los valores a partir de las 9 horas del inicio del estudio se vuelven positivos.

En la Figura 1c representamos la media en correlación con su desviación estándar en la que las barras de error más evidentes corresponden a las 9 horas y a las 9 y media horas. Durante las demás horas, las barras de error son muy baja, porque la desviación estándar es pequeña en comparación con los valores de la media y, por tanto, la variabilidad es baja.

Curva de crecimiento de las bacterias en presencia de antibiótico:

Horas	Muestra 1 CMI		Muestra 2 CMIX0,5		Muestra 3 NO CMI		Muestra 4 CMIX2	
	abs 600 nm		abs 600 nm		abs 600 nm		abs 600 nm	
3,00	0,224	0,209	0,213	0,224	0,237	0,242	0,193	0,201
6,00	0,310	0,301	0,345	0,347	0,367	0,410	0,244	0,257
6,50	0,338	0,345	0,383	0,386	0,408	0,468	0,277	0,284
7,20	0,375	0,378	0,423	0,433	0,451	0,540	0,287	0,304
7,50	0,407	0,408	0,468	0,465	0,487	0,600	0,310	0,326
9,40	0,583	0,584	0,662	0,670	0,691		0,478	0,515
10,10	0,654	0,647	0,703	0,712	0,736		0,440	0,501
24,35	2,588	2,624	2,648	2,672	3,016		1,466	1,472



- a)
- muestra 1 CMI
 - muestra 2 CMIX0,5
 - muestra 3 NO CMI
 - muestra 4 CMIX2
 - CMI 2
 - NO CMI 2
 - CMIX0,5 2
 - CMIX2 2

Horas	Log 1 CMI		Log 2 CMIX0,5		Log 3 NO CMI		Log 4 CMIX2	
	log10(abs) 600 nm		log10(abs) 600 nm		log10(abs) 600 nm		log10(abs) 600 nm	
3,00	-0,649	-0,679	-0,671	-0,649	-0,625	-0,616	-0,714	-0,696
6,00	-0,508	-0,521	-0,462	-0,459	-0,435	-0,387	-0,612	0,590
6,50	-0,471	-0,462	-0,416	-0,413	-0,389	-0,329	-0,557	-0,546
7,20	-0,426	-0,422	-0,373	-0,363	-0,345	-0,267	-0,542	-0,517
7,50	-0,390	-0,389	-0,329	-0,332	-0,312	-0,221	-0,508	-0,486
9,40	-0,234	-0,233	-0,179	-0,174	-0,160		-0,320	-0,288
10,10	-0,184	-0,189	-0,153	-0,147	-0,133		-0,356	-0,300
24,35	0,413	0,418	0,423	0,426	0,479		0,166	0,167

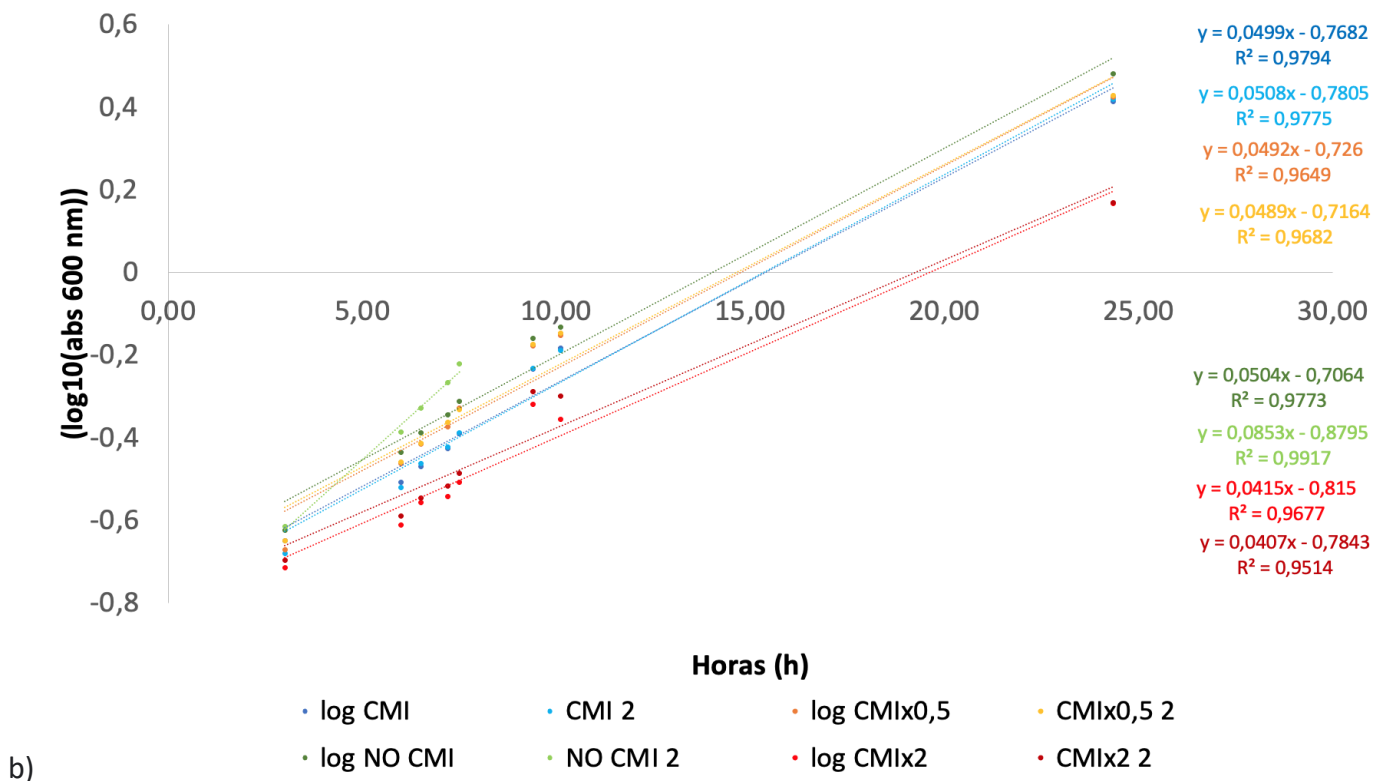


Fig.2. a) Curva de crecimiento de bacterias en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico rifampicina en un tiempo aproximativamente de 24 horas. Se representan los valores de absorbancia de las muestras CMI, CMIx0,5, NO CMI y CMIx2, replicadas dos veces, frente al periodo de tiempo del estudio. El crecimiento se muestra a través de rectas de regresión.

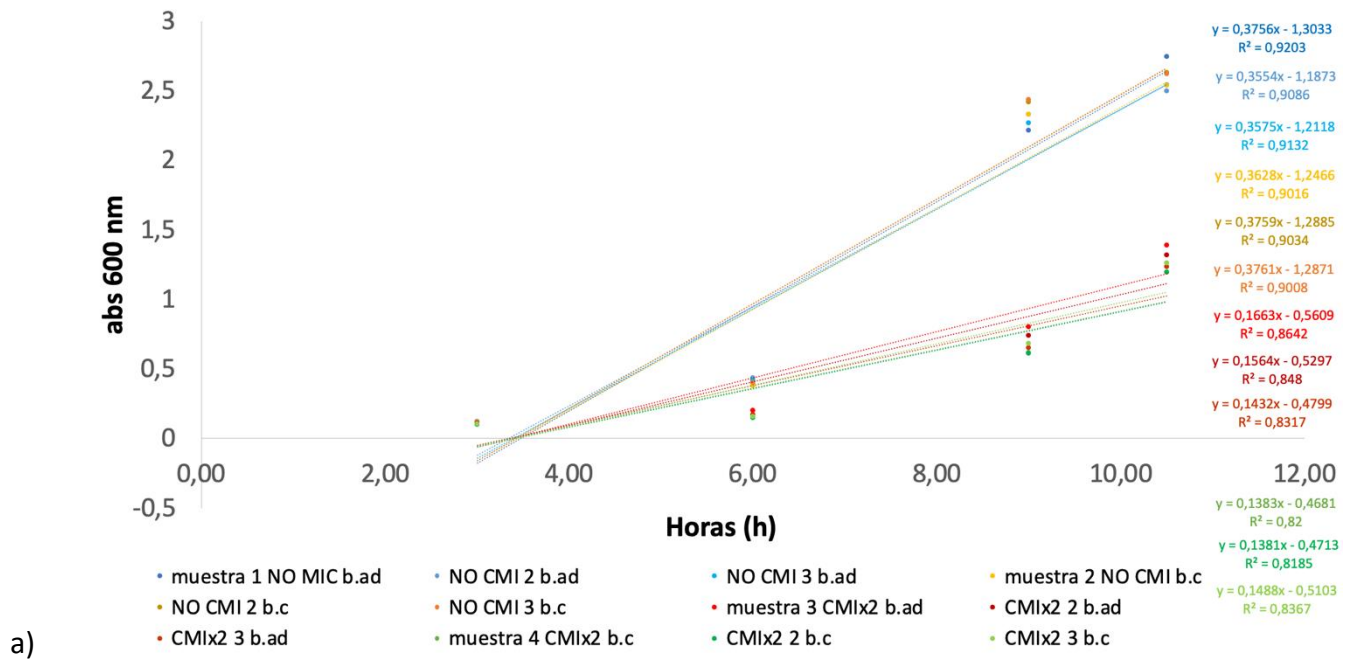
b) Curva de crecimiento de bacterias en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico representados en forma logarítmica (log CMI, log CMIx0,5, log NO CMI y log CMIx2) frente al periodo de tiempo del estudio.

En la Figura 2a podemos notar dos cosas: las bacterias de la muestra sin antibiótico (NO CMI) tienen los valores más altos en comparación con las muestras restantes; además, comparando las muestras con el antibiótico a diferentes concentraciones, podemos notar que aquellas con una concentración normal de CMI o con la mitad de la misma alcanzan valores de crecimiento más altos que la muestra con doble concentración de rifampicina, presentando también una mayor tasa de crecimiento.

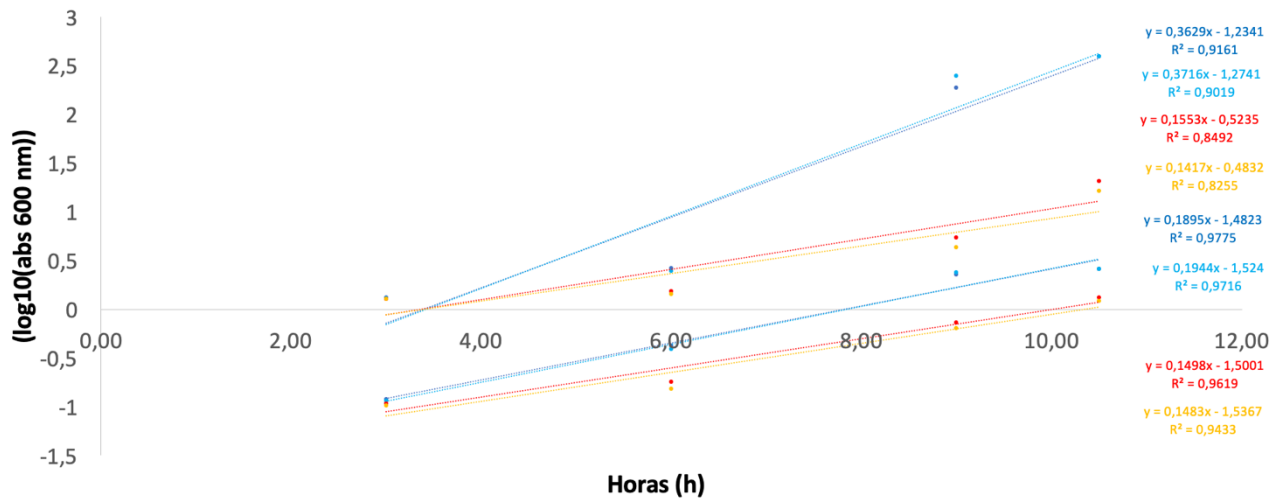
En la Figura 2b el gráfico muestra la curva de crecimiento de las bacterias en forma logarítmica con respecto al tiempo, destacando cómo las bacterias inoculadas en medio con el doble de concentración de CMI crecen a un ritmo más lento y por lo tanto alcanzan valores de crecimiento más bajos que todas las demás muestras

Resultados de la comparación entre bacterias *E.coli* control y bacterias adaptadas :

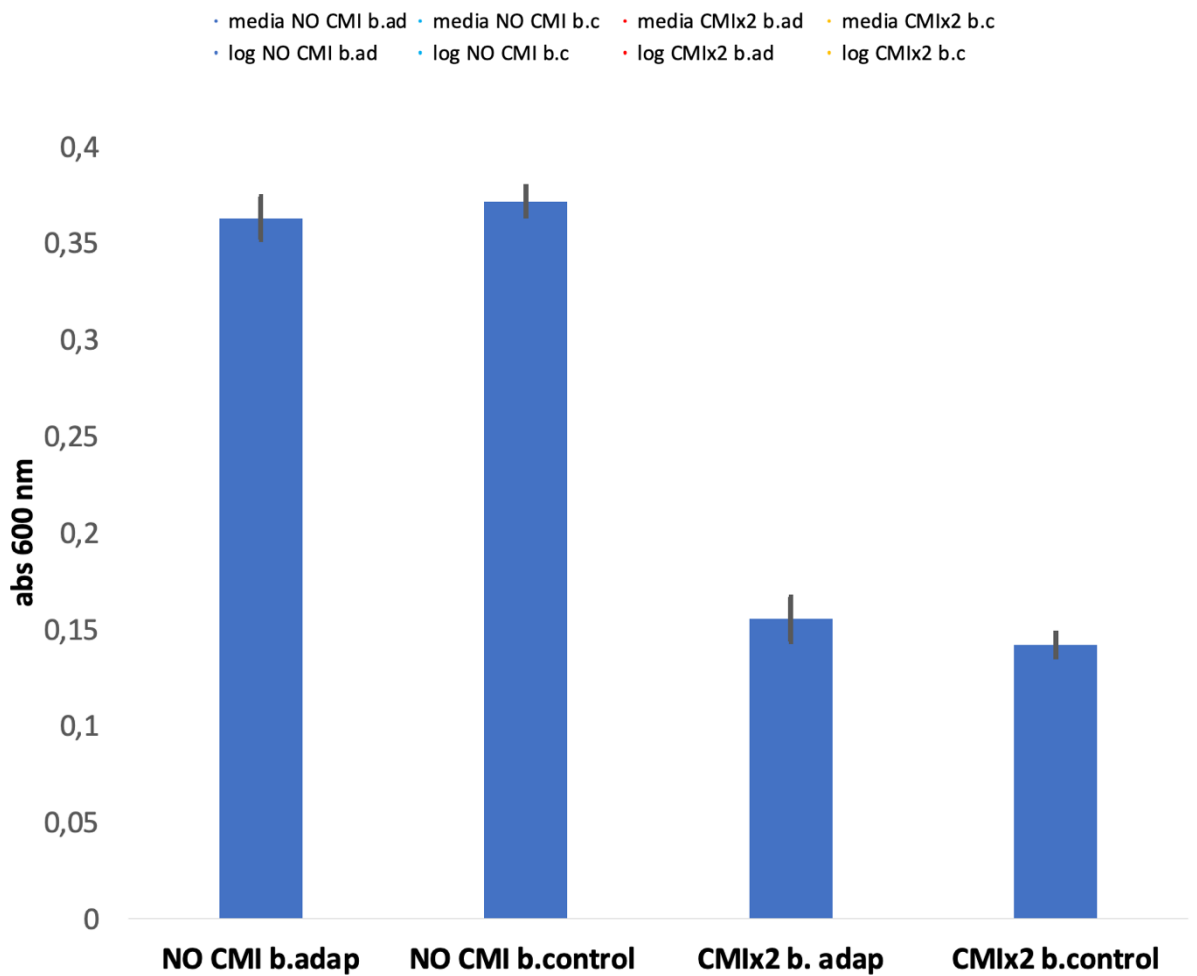
Horas	NO CMI 1 abs 600 nm			NO CMI 2 abs 600 nm			CMIx2 1 abs 600 nm			CMIx2 2 abs 600 nm		
	<i>1 b.ad</i>	<i>2 b.ad</i>	<i>3 b.ad</i>	<i>1 b.c</i>	<i>2 b.c</i>	<i>3 b.c</i>	<i>1 b.ad</i>	<i>2 b.ad</i>	<i>3 b.ad</i>	<i>1 b.c</i>	<i>2 b.c</i>	<i>3 b.c</i>
3,00	0,118	0,122	0,199	0,112	0,115	0,116	0,107	0,109	0,107	0,104	0,101	0,102
6,00	0,413	0,435	0,416	0,376	0,400	0,399	0,200	0,171	0,170	0,153	0,148	0,155
9,00	2,216	2,328	2,268	2,328	2,416	2,436	0,800	0,741	0,651	0,615	0,610	0,684
10,50	2,744	2,496	2,540	2,536	2,628	2,62	1,388	1,316	1,234	1,196	1,192	1,260



Horas	NO CMI b.ad	NO CMI b.c	CMIx2 b.ad	CMIx2 b.c	NO CMI b.ad	NO CMI b.c	CMIx2 b.ad	CMIx2 b.c
	log10(abs) 600 nm	log10(abs) 600 nm	log10(abs) 600 nm	log10(abs) 600 nm	log10(abs) 600 nm	log10(abs) 600 nm	log10(abs) 600 nm	log10(abs) 600 nm
	<i>Media por cada hora</i>				<i>Log por cada hora</i>			
3,00	0,119	0,114	0,107	0,102	-0,922	-0,941	-0,968	-0,989
6,00	0,421	0,391	0,180	0,152	-0,375	-0,407	-0,744	-0,818
9,00	2,270	2,393	0,730	0,636	0,356	0,379	-0,136	-0,196
10,50	2,593	2,594	1,312	1,216	0,413	0,414	0,118	0,085



b)



c)

Fig.3. Comparación entre bacterias de *E.coli* control y bacterias adaptadas al medio con la mitad de concentraciones de la CMI.

a) Valores de absorbancia de las 4 muestras triplicadas representadas respecto al tiempo del estudio. El crecimiento se muestra a través de rectas de regresión.

b) Medias de las muestras por cada hora y sus logaritmos frente al tiempo del estudio. El crecimiento se muestra a través de rectas de regresión.

c) Media de los valores de absorbancia de las 4 muestras. Sus desviaciones típicas están representadas a través de barras de error.

En la figura 3a podemos ver que las dos muestras sin el antibiótico alcanzan valores de crecimiento considerablemente más altos, casi el doble, en comparación con las dos muestras con el antibiótico a partir de la hora 9.

La figura 3b muestra la representación de la media y el logaritmo en función del tiempo, destacando la diferencia significativa entre las dos muestras sin el micro y las dos muestras con el doble de concentración del micro.

La figura 3c muestra cómo la media de las bacterias adaptadas y el control del medio sin el antibiótico es mucho mayor que el medio con el antibiótico.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo es ver el efecto de concentraciones de sub-CMI en el crecimiento a distintas concentraciones de rifampicina de las bacterias *E.coli*. Este objetivo fue posible al inocular las bacterias a diferentes de CMI, permitiendo así un número de crecimiento bacteriano diferente en los distintos medios.

También se inocularon las bacterias en medios en ausencia del antibiótico para crear la curva de crecimiento bacteriano. Después las bacterias además se inocularon en medios en presencia de diferentes concentraciones de rifampicina para crear otra curva de crecimiento bacteriano, con el fin de comparar las dos curvas para evaluar el desarrollo de las bacterias.

La curva de crecimiento de las bacterias [Fig.1a] sin antibiótico muestra un crecimiento exponencial. Los valores de absorbancia de tres muestras (TSB 1, TSB 2, TSB 3) de bacterias *E.coli* son muy similares entre sí durante las diferentes horas, pero en particular las muestras TSB 2 con la TSB 3. Como podemos ver en la Fig.1a hay un aumento exponencial del crecimiento de las bacterias desde las 6 horas hasta las 9 horas, en las que los valores de las bacterias son casi más del doble que al principio del crecimiento. Nos encontramos en una situación en la que las bacterias han superado la fase de adaptación para pasar a la fase exponencial en la que los microorganismos crecen y se dividen a la máxima velocidad posible. La colonia no aumenta en un número fijo de bacterias por unidad de tiempo, sino en un número proporcional al tamaño de la colonia. Por eso se llama crecimiento exponencial.

Estos resultados responden a uno de los objetivos de este trabajo, es decir, la creación de una curva de crecimiento bacteriano en ausencia del antibiótico en la que las bacterias pasan de una fase de

adaptación al medio (fase de latencia), con valores bajos y similares, especialmente TSB 2 y TSB 3, en los que las bacterias no se dividen y están en plena actividad metabólica, a una fase de crecimiento exponencial cuyos valores son casi el doble que al principio. Esto se debe a que los microorganismos se han adaptado y son capaces de multiplicarse y reproducirse a la máxima velocidad posible.

En la fig.1b los valores se representan en forma logarítmica frente al tiempo del estudio. El uso del logaritmo no cambia nada desde el punto de vista de los datos, pero la representación logarítmica se hace porque tiene algunas ventajas. Una de las ventajas es que cuando se tienen muchas células bacterianas y se necesita trazarlas en un gráfico con valores absolutos, sería muy difícil trazarlas porque se tendrían escalas muy grandes. Esto significa que el rango de variación de los datos es extremadamente alto y sólo el uso de logaritmos permite obtener un gráfico de tamaño aceptable. Además, la línea recta de la forma logarítmica es una muy buena prueba de la constancia de la tasa de crecimiento.

En la figura podemos ver en particular que los valores logarítmicos de la absorbancia son inicialmente negativos porque los valores de absorbancia correspondientes son menores que 1. Luego los valores de absorbancia aumentan, siendo mayores que 1, y así los valores logarítmicos aumentan volviéndose positivos. Esto es algo que se ha visto en otras investigaciones como en (Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005).

Lo que habríamos esperado era justamente este resultado, ya que habíamos visto [Fig.1a] que la curva de crecimiento de la muestra TSB 1 resultaba más baja justamente porque los valores, comparados con los de las otras dos muestras, eran menores. También en el caso de la representación logarítmica la representación de la muestra TSB 1 resulta ser inferior a las demás.

Una vez representada la curva de las bacterias tanto en forma de valores de absorbancia como en forma logarítmica, pasamos a representar la media y la desviación típica [Fig.1c].

En este caso, la desviación típica es pequeña en comparación con el valor de la media, en el sentido de que hay una baja variabilidad. Cuanto más se acerque la desviación típica a 0, más fiable será la media.

El único caso en el que se puede ver que la desviación típica es mayor en comparación con el valor de la media es a las 9 horas, donde se representa un pico, lo que significa que hay más variabilidad en los datos. El valor de la desviación ya no es acerca a 0 (como por ejemplo 0,01), sino que es de 0,562.

También aquí notamos siempre la misma correspondencia con los casos anteriores en los que vemos como la media de las primeras horas (entre las 0 horas y las 6 horas) es bastante baja, casi del mismo curso de la curva, representando la fase de latencia, [fig.1a] para luego aumentar todos juntos pasadas las 6 horas para representar la fase exponencial.

En el primer experimento mostramos cómo se comportaban las bacterias sin el antibiótico, observando que durante las primeras horas desde el inicio del crecimiento se reproducían lentamente y se desarrollaban muy poco, sólo después de pasar la fase de latencia las bacterias eran capaces de crecer considerablemente a una velocidad máxima representando la fase exponencial. Ahora veremos cómo reaccionan las bacterias a un medio con antibiótico y las compararemos entre sí.

Cuando las bacterias están introducidas en un medio donde está presente la rifampicina a diferentes concentraciones, ellas se comportan en manera diferentes: pueden ser más o menos adaptadas, pueden crecer más o menos, tener una tasa de reproducción mayor o menor. En concreto hemos trabajado a concentración normal de la CMI, al doble de la CMI ($CMI \times 2$), a la mitad de la CMI ($CMI \times 0,5$) y sin rifampicina (NO CMI).

Con los resultados obtenidos se puede ver [Fig.2a] como las bacterias inoculadas en un medio sin el antibiótico, en comparación con las bacterias introducida en un medio en presencia del antibiótico (no es importante a que concentración de esto), crece más. Esto es posible porque obviamente si en el medio el antibiótico, que es capaz de frenar o detener la proliferación de las bacterias, no está, las bacterias crecen mas respecto a cuando está el antibiótico porque no habrá nada que impida su crecimiento (Moroz, Glatman, Neshchadim, & Khanina, 1975).

Pero si se observa las bacterias introducidas en un medio con la mitad de concentración de la CMI y el doble de concentración de la CMI se puede ver que con la mitad de la CMI han crecido más que cuando se inoculan en un medio con el doble de concentración de CMI. El simple hecho de que las bacterias que tienen un medio con menos antibiótico tienen más oportunidades y libertad para crecer, para reaccionar mejor entre sí para el desarrollo, y también tienen una mayor tasa de reproducción (Ranieri, Whitchurch, & Burrows, 2018) (Jin, et al., 2020) (Doan, Yen-Nicolaÿ, Bernet-Camard, Martin-Verstraete, & Péchiné, 2020). Todo esto se puede ver en el grafico [Fig.2a] en la que las líneas de las bacterias en $CMI \times 0,5$ son más altas que las de $CMI \times 2$ que tienen una menor inclinación y, por tanto, un desarrollo más lento. Esto es esperable ya que las bacterias en $CMI \times 0,5$ tienen concentraciones de rifampicina que es menor.

Esto es algo que se ha visto en otras investigaciones como en (Zhang, et al., 2000).

De acuerdo con la misma razón de la curva sin antibiótico, también en este caso [Fig.2b] los valores se han representado en forma logarítmica, y también se puede ver que, durante las primeras horas de crecimiento, en las que las bacterias deben comenzar a adaptarse al medio en el que fueron inoculadas (fase de latencia) para luego pasar a lo que es la fase exponencial, es decir, la fase de crecimiento y desarrollo, las bacterias tienen valores de logaritmo de la absorbancia negativos. Si se compara este resultado con el anterior de la curva de crecimiento de las bacterias sin antibiótico nos daremos cuenta de que la velocidad que tomaban las bacterias anteriormente era mayor que ahora. Los valores positivos, en el caso de la curva sin antibiótico, se obtenían antes de las 9 horas, en este caso sólo después de las 10 horas desde el inicio del crecimiento. Esto nos hace comprender cómo un medio con antibiótico, incluso en mínima concentración, puede alterar la reproducción de las bacterias y su velocidad de formación (Joon Oh, et al., 2019) (Ling, et al., 2015).

Además, es suficiente comparar los valores de los logaritmos entre las diferentes concentraciones de CMI. Es evidente que las bacterias inoculadas en un medio al valor de la CMI, a la mitad y sin él tienen valores casi similares entre sí, excepto las bacterias en un medio con el doble de CMI. Esto significa que el antibiótico, al estar presente en mayor cantidad, bloquea la acción de las bacterias, la ralentiza mucho, no hace que se reproduzcan y por tanto tienen poca resistencia a este tipo de medio.

Una vez realizadas las dos curvas de crecimiento bacteriano, una sin el antibiótico y la otra en presencia del antibiótico, el otro experimento consistía en el realizar 4 muestras con 3 replicas cada una. Dos de estas 4 muestras tenían un medio sin la concentración de la CMI, y las otras dos con un medio al doble de la CMI. Se utilizaron bacterias *E.coli* de control y bacterias ya adaptadas a un medio con el antibiótico, en concreto un medio con la mitad de CMI. Cuando hablamos de "bacterias adaptadas" nos referimos a microorganismos que tienen la capacidad de cambiar sus procesos metabólicos, fisiológicos y de comportamiento, lo que les permite adaptarse a las condiciones del entorno en el que viven. Por lo tanto, un organismo que ha evolucionado a lo largo de un determinado período de tiempo como efecto de la selección natural, de tal manera que aumenta el éxito reproductivo de ese organismo (Adaptación biológica, 2020).

Se inocularon estos dos tipos de bacterias tanto en las dos muestras sin CMI como en las dos muestras con el doble de CMI. Se compararon los resultados para ver cuál de los dos tipos de bacterias crecía más y en qué tipo de medio tenían su máximo crecimiento.

Los resultados de este experimento han permitido constatar que las bacterias, tanto las de control como las ya adaptadas, han crecido más en el medio sin rifampicina, en comparación con el medio con el doble de CMI. Se puede ver [Fig.3a] como los valores de las bacterias al principio de las primeras 6 horas, en los dos medios sin el CMI, han crecido lentamente, no variando mucho su concentración; después de 6 horas las bacterias han comenzado lo que se llama fase exponencial, es decir se han desarrollado considerablemente a máxima velocidad alcanzando valores muy altos, pasando de valores casi nulos a valores doble.

Una cosa completamente diferente ocurrió con las bacterias, tanto las de control como las adaptadas, introducidas en los dos medios a doble concentración de CMI. Las bacterias se desarrollaron, creciendo más sólo después de 9 horas desde el inicio de su crecimiento alcanzando valores que no eran extremadamente altos. De hecho, si se observa el gráfico [Fig3a] se puede ver que las líneas de las bacterias inoculadas en los medios al doble de CMI son más bajas.

Otra observación a realizar es tener en cuenta los medios sin el CMI, se puede ver que las bacterias adaptadas y de control varían muy poco sus valores tanto que en la gráfica las líneas rectas están muy próximas. En concreto, las bacterias adaptadas son tan parecidas a las de control porque son bacterias que se habían adaptado previamente a un medio en presencia del antibiótico, por lo que pudieron desarrollar esas características de resistencia al antibiótico permitiéndoles crecer y tener valores similares a las bacterias de control.

Por otro lado, si observamos los medios con el doble de CMI, podemos ver inmediatamente que las bacterias adaptadas tienen valores más altos que las de control, y esto también se puede ver en el gráfico donde las líneas se suceden. La razón por la que tienen valores más altos es siempre la misma: ya se habían adaptado a un medio a mitad de la concentración de la CMI y, por tanto, ya estaban acostumbrados a crecer en presencia de antibióticos. Mientras que las bacterias de control, es decir, las bacterias *E.coli*, que no se habían adaptado previamente, tenían más dificultades para reaccionar en presencia del mismo.

En este caso en la Figura 2b representamos los valores en forma logarítmica incluyendo también las medias de las muestras en cada hora con respecto al tiempo. El conjunto se ha representado con las líneas de regresión en las que existe una estrecha correlación entre las líneas de la media y las del logaritmo. Estos últimos se sitúan en su mayoría en el cuarto cuadrante del eje cartesiano, por

lo que los valores del crecimiento resultan negativos. En particular, existe una diferencia entre los valores de las bacterias inoculadas en medio sin el antibiótico y las inoculadas con el doble de concentración de CMI. De hecho, estas últimas alcanzan valores positivos sólo después de 10 horas y media desde el inicio del crecimiento, lo que significa que tienen una tasa de crecimiento muy baja.

Otra demostración del crecimiento bacteriano se da en la Figura 1c, donde este gráfico muestra el promedio de las 4 muestras, cuyos valores se calcularon a una absorbancia de 600nm. Esta media es claramente superior en las 2 medias en ausencia del CMI.

A partir de los resultados obtenidos en este experimento podemos reiterar que las bacterias si están en un medio con el doble de concentración del CMI tienen dificultades para crecer porque el antibiótico, presente a altas concentraciones, bloquea su acción; a diferencia de las bacterias que están en un medio sin antibiótico

CONCLUSIONES

En conclusión, podemos decir es que:

1. En la curva de las bacterias a diferentes concentraciones de rifampicina no se muestra la misma tendencia porque las bacterias responden de forma diferente debido a la acción de la rifampicina sobre los microorganismos. A partir de estas líneas es posible entender que los microorganismos son resistentes a bajas concentraciones de CMI, permitiendo así la plasticidad fenotípica, es decir, la capacidad de un individuo de desarrollar diferentes fenotipos en relación con diferentes condiciones ambientales. Así, la rifampicina es capaz de contrarrestar los microorganismos cuando están presentes en cantidades elevadas, matándolos o impidiendo su proliferación.
2. La curva que no tiene rifampicina tiene un crecimiento exponencial sorprendente en el que las bacterias se adaptan inicialmente al medio en el que viven depredándose en cantidades muy bajas, tanto que durante esta fase de latencia no se dividen, comienzan la síntesis de enzimas, el aumento del material celular. Al cabo de unas horas, habiéndose adaptado al medio, crecen exponencialmente (fase exponencial) dividiéndose de forma masiva con una velocidad constante, cuya mortalidad se reduce al mínimo y la duplicación es máxima. Así lo demuestran los resultados obtenidos, en los que los valores se duplican considerablemente después de 6 horas desde el inicio del crecimiento.

3. La diferencia entre las bacterias adaptadas y las bacterias de control nos ha permitido comprender cómo las bacterias adaptadas son similares a las bacterias de control cuando ambas se inoculan en un medio sin rifampicina, mientras que cuando se inoculan en un medio al doble de CMI las bacterias adaptadas tienen valores más altos porque se habían adaptado previamente a un medio con antibiótico.

CONCLUSIONS

In conclusion, we can say that:

1. The curve of bacteria at different concentrations of rifampicin does not show the same trend because the bacteria respond differently due to the action of rifampicin on the microorganisms. From these lines it is possible to understand that microorganisms are resistant to low MIC concentrations, thus allowing phenotypic plasticity, i.e. the ability of an individual to develop different phenotypes in relation to different environmental conditions. Thus, rifampicin is able to counteract micro-organisms when present in high numbers, killing them or preventing their proliferation.
2. The curve without rifampicin has a surprising exponential growth in which the bacteria initially adapt to the environment in which they live by predateding themselves in very low quantities, so much so that during this latency phase they do not divide, begin enzyme synthesis, increase cellular material. After a few hours, having adapted to the environment, they grow exponentially (exponential phase), dividing massively at a constant rate, with mortality reduced to a minimum and duplication at a maximum. This is demonstrated by the results obtained, in which the values double considerably after 6 hours from the start of growth.
3. The difference between the adapted bacteria and the control bacteria has allowed us to understand how the adapted bacteria are similar to the control bacteria when both are inoculated in a medium without rifampicin, while when inoculated in a medium at twice the MIC, the adapted bacteria have higher values because they had previously adapted to a medium with antibiotic.

BIBLIOGRAFIA

Alejandra Rodríguez-Verdugo, B. S. (2013). Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evolutionary Biology* .

- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014, Mayo 27). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, p. 465-478.
- Andrews, J. M. (2001, Julio 01). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. 5-16.
- Antibiotic use: present and future. (2007). *New Microbiol.*, 321-325.
- Antimicrobial resistance*. (2020, Octubre 13). Tratto da World Health Organization: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Batteri Resistenti agli Antibiotici*. (2018, Septiembre 25). Tratto da LAB TESTS ONLINE: <https://labtestsonline.it/articles/batteri-resistenti-agli-antibiotici>
- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009, Agosto). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales. *ELSEVIER*, 7(4), p. 214-217.
- Cuevas, D. A., & Edwards, R. A. (2017, Junio 15). PMAAnalyzer: a new web interface for bacterial growth curve analysis. *Bioinformatics*, 1905-1906.
- D I Andersson, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, 489-493.
- Davies, J., Spiegelman, G. B., & Yim, G. (2006, Agosto 30). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *ScienceDirect*, p. 445-453.
- Davies, J., Spiegelman, G. B., & Yim, G. (2006, Agosto 30). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol*, p. 445-453.
- Doan, T.-H.-D., Yen-Nicolaÿ, S., Bernet-Camard, M.-F., Martin-Verstraete, I., & Péchiné, S. (2020, Noviembre 9). Impact of subinhibitory concentrations of metronidazole on proteome of Clostridioides difficile strains with different levels of susceptibility. *PLoS One*.
- Donga, G., Lib, J., Chenb, L., Bia, W., Zhangb, X., Liub, H., . . . Cao, J. (2019, Febrero). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of Escherichia coli. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, p. 15-21.
- F Baquero, M. C. (1998). Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis*.
- Florian M E Wagenlehner, R. B.-J. (2013). Antibiotic stewardship: a call for action by the urologic community. *Eur Urol.*, 358-360.
- GALÁN, J. C., BAQUERO, M. R., MOROSINI, M. I., & BAQUERO, F. (2006, Marzo 03). Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *High mutation rate bacteria: Risks of a high-speed life*.
- Geeraerd, A., Valdramidis, V., & Van Impe, J. (2005, Junio 25). GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 95-105.
- Gemmellaro, S. (2019). Staphylococcus aureus. *microbiologia italia*.
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014, Enero). Growth Rates Made Easy. *Molecular Biology and Evolution*, 232-238.
- Hinton-Sheley, P., & B.Sc. (2019, Febrero 26). *Horizontal Gene Transfer and Antibiotic Resistance*. Tratto da NEWS MEDICAL LIFE SCIENCES: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Horizontal-Gene-Transfer-and-Antibiotic-Resistance.aspx>
- Hughes, D. I. (2014, Mayo 27). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*.
- Hughes, D. I. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*.
- Hughes, D. I. (2014, Mayo 27). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*.
- Hughes, D. I. (2014, Mayo 27). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*.
- Ileana Andreea Ratiu, V. R.-B. (2019). Temporal influence of different antibiotics onto the inhibition of Escherichia coli bacterium grown in different media. *Anal Biochem*.
- ISO . (2019, Diciembre). Tratto da ISO : <https://www.iso.org/standard/70464.html>
- Jin, Y., Guo, Y., Zhan, Q., Shang, Y., Qu, D., & Yu, F. (2020, Febrero 21). Subinhibitory Concentrations of Mupirocin Stimulate Staphylococcus aureus Biofilm Formation by Upregulating cidA. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Joon Oh, K., Romero, R., Yoon Park, J., Lee, J., Conde-Agudelo, A., Hong, J.-S., & Hyun Yoon, B. (2019, Agosto). Evidence that antibiotic administration is effective in the treatment of a subset of patients with intra-amniotic infection/inflammation presenting with cervical insufficiency. *Am J Obstet Gynecol*.
- JUAN CARLOS GALÁN, M. R. (2006, Marzo 3). Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *High mutation rate bacteria: Risks of a high-speed life*.
- Julian Davies, G. B. (s.d.). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Sciencw*.

- LAB TESTS ONLINE. (2018, Septiembre 27). Tratto da LAB TESTS ONLINE: <https://labtestsonline.it/articles/batteri-resistenti-agli-antibiotici>
- Laneve, G. (2019, Dicembre 04). *Antibiotico resistenza: cos'è e in che modo ci riguarda*. Tratto da Pharmercure: <https://www.pharmercure.com/blog/index.php/antibiotico-resistenza-cose-e-in-che-modo-ci-riguarda/>
- Lieberman, J. M. (2003). Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr Infect Dis J.* , 1143-1151.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., . . . Steadman, V. A. (2015, Enero 22). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, p. 455-459.
- Matthew Mueller, C. R. (2020). Escherichia Coli. *StatPearls*.
- MedlinePlus. (2019). Tratto da MedlinePlus: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682403.html>
- Melissa Ellermann, V. S. (2020). Bacterial signaling as an antimicrobial target. *Curr Opin Microbiol.*, 78-86.
- microbiologiaitalia. (s.d.). Tratto da microbiologia italia.
- microbiologiaitalia. (2020, luglio 27). Tratto da microbiologiaitalia: <https://www.microbiologiaitalia.it/farmacologia/gli-antibiotici-utilizzo-ed-antibiotico-resistenza/>
- Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics . (2014). *REVIEWS*, 14.
- Minniti, M. (2020, Agosto 3). *La crescita batterica* . Tratto da microbiologiaitalia: <https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/la-crescita-batterica/>
- Moroz, A. F., Glatman, L. I., Neshchadim, G. N., & Khanina, M. F. (1975, Febrero). Possible mechanisms of the rifampicin suppression of the conjugation transfer of R-factors in Escherichia coli. *Antibiotiki*, p. 119-126.
- Mueller, M. (2020). Escherichia Coli. *PubMed*.
- Mueller, M., & Tainter, C. R. (2020). Escherichia Coli. *StatPearls* .
- Multidrug-resistant bacteria. (s.d.). Tratto da ReActGroup.org: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/multidrug-resistant-bacteria/>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016, Abril). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*.
- Orr, H. A. (2005). The genetic theory of adaptation: a brief history. *nature reviews genetics* , 119-127.
- Portia Mira, M. B. (2017). Statistical Package for Growth Rates Made Easy. *Mol Biol Evol.* , 3303-3309.
- R Colgan, J. H. (2001). Appropriate antimicrobial prescribing: approaches that limit antibiotic resistance. *Am Fam Physician.*, 999-1004.
- Ramamurthi, P. J. (2017). Bacterial Cell Division: Non-models Poised to Take the Spotlight. *Annu Rev Microbiol.*, 393-411.
- Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B., & Burrows, L. L. (2018, Octubre). Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol*, p. 164-169.
- REVIEWS. (2014, May 27). Microbiological effects od sublethal levels of antibiotics . p. 14.
- Rifampin. (s.d.). Tratto da WebMD: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-1744/rifampin-oral/details>
- Rifampin. (2019). Tratto da MedlinePlus: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682403.html>
- Robert A Edwards, D. A. (2017). PMAAnalyzer: a new web interface for bacterial growth curve analysis. *Bioinformatics*, 1905-1906.
- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobi. (2019, Diciembre). *ISO/TC 212 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems*, 19.
- Tryptic Soy Agar (TSA). (2019). *microbiologia italia* .
- Tryptic Soy Agar. (2019, Abril 18). Tratto da Microbe Notes: <https://microbenotes.com/tryptic-soy-agar/>
- Tryptic Soy Broth (TSB). (2019). *microbiologiaitalia*.
- Vanessa M D'Costa, C. E. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature.*, 457-461.
- Waclaw, B. (2016). Evolution of Drug Resistance in Bacteria. *Adv Exp Med Biol*, 949-967.
- Zhang, L., Fan, F., M.Palmer, L., Lonetto, M. A., Petit, C., L.Voelker, L., . . . McDevitt, D. (2000, Septiembre 9). Regulated gene expression in Staphylococcus aureus for identifying conditional lethal phenotypes and antibiotic mode of action. *Gene* , 297-305.
- Zinner, S. H. (2007, Julio). Antibiotic use: present and future. *New Microbiologica*, p. 321-325.