

MicroMundo: En busca de bacterias del suelo productoras de antibióticos

Martín Carballo Canosa, Diego González Saavedra y Jorge García Vázquez

Trabajo encuadrado en el ámbito STEMbach del IES Eduardo Blanco Amor
Bienio 20-22

Dirigido por

Dra. María José Pérez

Dra. Julia Carballo

Área de Microbiología

Facultad de Ciencias Campus
Ourense

Dr. Francisco Boán

Dpto. de Biología y Geología

IES Eduardo Blanco Amor Ourense

Universida_{de}Vigo



Introducción

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas, es decir, con una molécula de ADN libre en el citoplasma y por lo tanto sin la presencia de un núcleo (figura 1). Se caracterizan por una capacidad para multiplicarse rápidamente por fisión binaria. Suelen presentarse formando colonias (formadas únicamente en superficies sólidas) que constituyen poblaciones celulares procedentes de una sola célula, dando lugar a un clon de dichas células. Las bacterias pueden clasificarse en dos grandes grupos según la estructura de su pared celular:

- Gram-negativas: son bacterias en las que el peptidoglucano, que constituye la pared celular, está localizada en un periplasma que se encuentra entre dos membranas (figura 1). Son más resistentes a los antibióticos.
- Gram-positivas: bacterias cuya pared está compuesta por una capa gruesa de peptidoglucano y carecen de membrana externa a diferencia de las anteriores (figura 1).

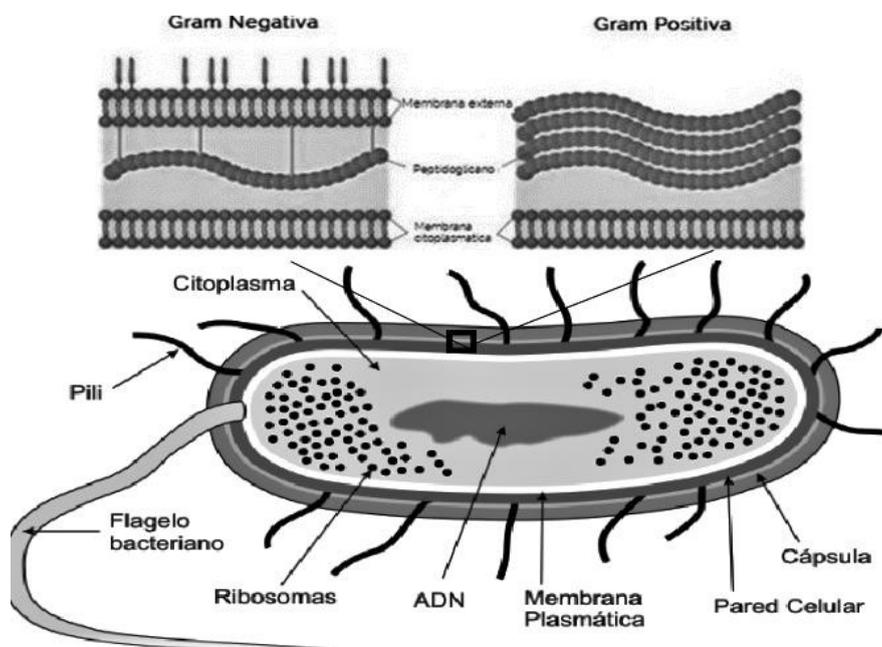


Figura 1 Estructura básica bacteriana. Se observan las diversas partes de una bacteria, además de diferenciar la pared bacteriana de una Gram-negativa y una Gram-positiva.

Las bacterias se pueden encontrar en cualquier medio, hasta en las condiciones más extremas de temperatura y presión (bacterias extremófilas). Aunque son muy numerosas, debido a su pequeño tamaño solo representan menos de la mitad de la biomasa microbiana total. Cuando dos tipos de bacterias se encuentran en un mismo ambiente, pueden desarrollar capacidades competitivas, produciéndose inhibición entre ellas.

Si en el ambiente en el que viven hay antibióticos, las bacterias que mutan al azar, pueden desarrollar una mutación que las hace resistentes a estos, que serán las que sobrevivan. Los antibióticos son moléculas generadas de forma natural por los microorganismos. Los humanos las utilizamos para prevenir y tratar las infecciones bacterianas.

El descubrimiento del primer antibiótico (la penicilina) se remonta a 1897, con los trabajos realizados por el francés Duchesne, empleando el hongo del género *Penicillium*. Estos trabajos pasaron desapercibidos hasta que Fleming (1881-1955) en 1928 detectó en su laboratorio placas de cultivo de estafilococo que habían sido contaminadas accidentalmente con un hongo. Fleming se dio cuenta de que alrededor del hongo no había crecimiento de estafilococo, generándose así halos de inhibición de crecimiento de estas, mientras que otras colonias más lejanas estaban intactas. Fleming hizo crecer el moho en un cultivo puro y descubrió que producía una sustancia que mataba a varias bacterias causantes de enfermedades. Identificó el moho como perteneciente al género *Penicillium* y llamó a la sustancia penicilina. Tras los estudios de Dorothy Hodgkin, capaz de cristalizar la penicilina para su posterior uso en medicina, y de Andrew Moyer, que mejoró el proceso de cultivo de la penicilina sustituyendo en cultivo en superficie por una fermentación con cultivo sumergido; Florey y Chain en 1935 colaboraron en la investigación para estudiar dicha sustancia.

Florey y Chain identificaron la molécula y consiguieron extender su utilización en medicina. En 1945 se concedió el premio Nobel de fisiología y medicina a Fleming, Florey y Chain por el descubrimiento, caracterización y utilización médica de la penicilina.

Desde hace ya cierto tiempo la resistencia de las bacterias a los antibióticos empleados para el tratamiento de las infecciones disminuye su eficacia. La principal causa es la presión selectiva que se produce cuando algunos clones bacterianos no son sensibles al antibiótico usado para tratar la infección y las bacterias que sobreviven pueden seguir multiplicándose e incluso mejorando dicha resistencia. Dicho proceso de selección natural avanza lentamente en condiciones naturales. Sin embargo, esta velocidad aumenta debido al intercambio de genes de resistencia a antibióticos entre diferentes clones bacterianos mediante, por ejemplo, plásmidos (fragmentos de ADN bacteriano que pueden transferirse entre bacterias) en la conjugación bacteriana o en otros mecanismos de transferencia de información genética como la transducción o la transformación. Un ejemplo de la evolución de este fenómeno es el cambio en la efectividad de la penicilina a lo largo de los años, si cuando se introdujo este antibiótico en la medicina la gran mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles, actualmente lo son menos del 5%. De hecho, si el *Penicillium* que permitió a Fleming descubrir la penicilina hubiera contaminado muchos de los cultivos actuales de *Staphylococcus aureus*, es muy dudoso que la hubiese descubierto, ya que muchos clones serían resistentes al antibiótico producido por el hongo.

La comunidad científica ha llegado a la conclusión de que en torno al año 2050 la muerte por infección debido a cepas resistentes será la más común, debido al incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos (figura 2). Por otro lado, desde hace aproximadamente treinta años no se

descubre una familia nueva de antibióticos, y hace diez que se aisló el último de una familia ya existente. Por estos motivos se hace imprescindible encontrar nuevos antibióticos, cuestión que motiva al desarrollo de planes en este sentido por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 2012. Esto en parte es debido a que se destina muy poco dinero para la búsqueda de nuevos antibióticos, pues menos del 5% del capital invertido en I+D farmacéutico entre 2003 y 2013 se dirigió al descubrimiento de antimicrobianos.



Figura 2 Esquema que muestra las principales causas de propagación de la resistencia bacteriana (propuesta por la OMS)

Contextualización y justificación de la investigación

Dada la preocupación mundial por el incremento de la resistencia a los antibióticos, distintas iniciativas han aparecido por todo el mundo para encontrar nuevos antibióticos. Entre ellas se encuentra el proyecto MicroMundo, proyecto de ciencia ciudadana destinado a buscar bacterias del suelo productoras de antibióticos. Esta iniciativa es la aplicación al mundo hispanoportugués hablante de proyectos nacidos en Estados Unidos como *Tiny Earth* y *Small World Initiative*.

El presente trabajo de investigación tiene el objetivo de buscar bacterias en suelos con propiedades antibacterianas frente bacterias testigo que con más frecuencia presentan resistencia a antibióticos comúnmente utilizados en clínica.

Material y Métodos

Recolección de muestras

Para la realización del estudio se obtuvieron 3 muestras de suelo procedentes de 3 espacios diferentes situados en la provincia de Ourense.

Las muestras se recogen a una profundidad de aproximadamente 3 cm en suelos mayoritariamente arenosos. Para recoger la muestra se utiliza una pequeña espátula la cual posteriormente será introducida en un tubo estéril, utilizando guantes para guardar las mayores condiciones de esterilidad posibles. Se identifica la muestra y se refrigera en un frigorífico convencional a una temperatura de 4°C hasta su traslado al laboratorio.

Aislamiento de las bacterias

En todo momento se emplea un mechero Bunsen para mantener un ambiente aséptico. Cada uno de los tubos y placas donde se encuentran microorganismos se mantienen cerrados y se abren solo en presencia del mechero para evitar contaminaciones externas de la muestra. Se rotula una serie de 4 placas conteniendo Agar Nutritivo, así como una batería de tubos estériles de manera ordenada con las disoluciones que se van a utilizar. Equipados con guantes y una bata de laboratorio, seleccionamos un gramo de cada una de las muestras empleando una báscula y un tubo estéril idéntico al utilizado para la recolección de las muestras. De esta manera se consigue tarar la balanza al mismo tiempo que se evitan contaminaciones. El resto de suelo se deposita en un

contenedor para desechos biológicos. Con este gramo de tierra se procede a preparar 4 diluciones seriadas para cada una de las tres muestras. Con un gramo de suelo de cada muestra y 9 mL de una disolución salina isotónica a pH 7.0 se prepara la primera dilución de 10^{-1} . Se homogeniza por agitación en el vórtex a temperatura ambiente durante 30 segundos. Este procedimiento se repite para cada una de las muestras objeto de estudio. Alícuotas de 1 mL se transfieren a tubos con la misma disolución salina estéril pH 7.0. Se repiten en cuatro ocasiones más, cada una a partir de la anterior. En la figura 3 se muestra de forma gráfica el procedimiento anteriormente escrito para preparar las diluciones decimales seriadas.

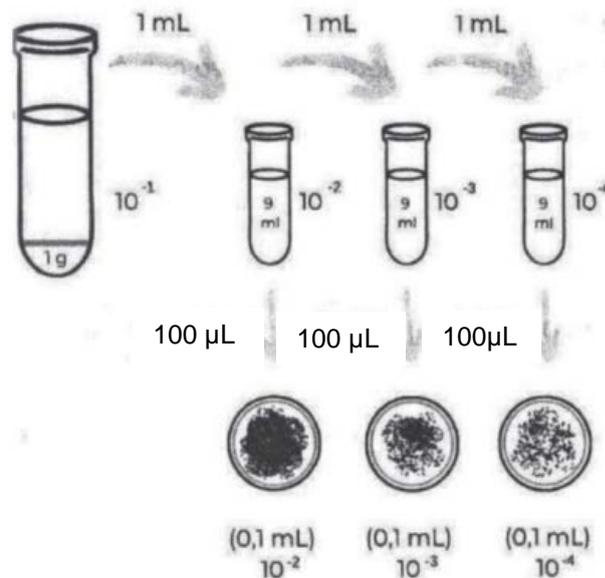


Figura 3 Esquema de la elaboración de las diluciones y siembra en placas

Una vez realizadas las diferentes diluciones que se utilizan para el estudio, son sembradas utilizando el método Copacabana en placas con medios conteniendo Agar Nutritivo. En el caso de la dilución 10^{-1} también se utiliza el medio de cultivo Agar Actinomicetes, favorecedor del crecimiento de actinobacterias. Para ello, se pipetea 100 µL de la dilución correspondiente y se deposita en la superficie del medio. Se abre el tubo

con las esferas estériles empleadas para este método y se depositan 10-12 de estas en el medio de cultivo. Se extiende la muestra en la placa de cultivo rotándola periódicamente a aproximadamente 60 grados en giro.

Una vez que el inóculo se haya absorbido, se extraen las bolas y se depositan en un contenedor para desechos biológicos. Tras lo cual se introducen en una estufa a una temperatura de 25°C durante 48h.

Se realiza un recuento de las colonias que crecen en cada placa para calcular así la concentración de microorganismos en la muestra original. Al mismo tiempo que se realiza el recuento se lleva a cabo la búsqueda de aquellas colonias que parecen interesantes a nivel morfológico o que muestren indicios de actividad antimicrobiana, como por ejemplo la presencia de halos de inhibición que las colonias hayan provocado para ralentizar o paralizar el crecimiento de las bacterias contiguas a ellas.

Las colonias seleccionadas de entre todas las placas se vuelven a sembrar en una placa maestra de 14 cm de diámetro con medio de cultivo Agar Nutritivo. Se dibuja una cuadrícula que muestra a su vez 25 cuadrículas de 1x1 cm, posteriormente y mediante la utilización de asa de siembra se cogen independientemente cada una de las colonias interesantes para volverlas a sembrar en cada una de las cuadrículas de la placa maestra. Esta se incuba a 30°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se siembran otra vez las 25 colonias en dos placas conteniendo el medio de cultivo Müller-Hinton en donde se han sembrado en césped con anterioridad dos bacterias testigo, una Gram-positiva (*Staphylococcus epidermidis*) y otra Gram-negativa (*Escherichia coli*) para detectar si producen inhibición de crecimientos contra estas bacterias. Estas dos placas se incuban a 30°C durante 72h. Transcurrido este período de tiempo, se buscan en ambas placas indicios de actividad antibacteriana frente a las especies bacterianas testigo antes mencionadas.

Resultados y Discusión

Para la realización del estudio se obtuvieron 3 muestras de suelo procedentes de 3 espacios diferentes situados en la provincia de Ourense.

A continuación, se indican los nombres de los diferentes espacios y sus coordenadas de latitud y longitud respectivamente:

- Parque Puente Romano, Ourense ciudad 42,3465720, -7,8674364.
- Parque da Liberdade, Ourense ciudad 42,3135944, -7,8842086.
- Urbanización Veiga de Abaixo, Pereiro de Aguiar 42,33483, -7,76926.



Figura 4 Toma de muestra de suelo

El principal objetivo que nos planteamos es detectar entre las bacterias de la muestra de suelo que tomamos aquellas que sean capaces de manifestar actividad antibiótica frente a especies pertenecientes a las bacterias testigo empleadas. Para alcanzar dicho objetivo cada miembro del grupo llevó a cabo una serie de diluciones de la muestra original (figura 5), en las que observamos una gran variedad de colonias bacterianas diferentes y entre las que se producían halos de inhibición en algunos casos.

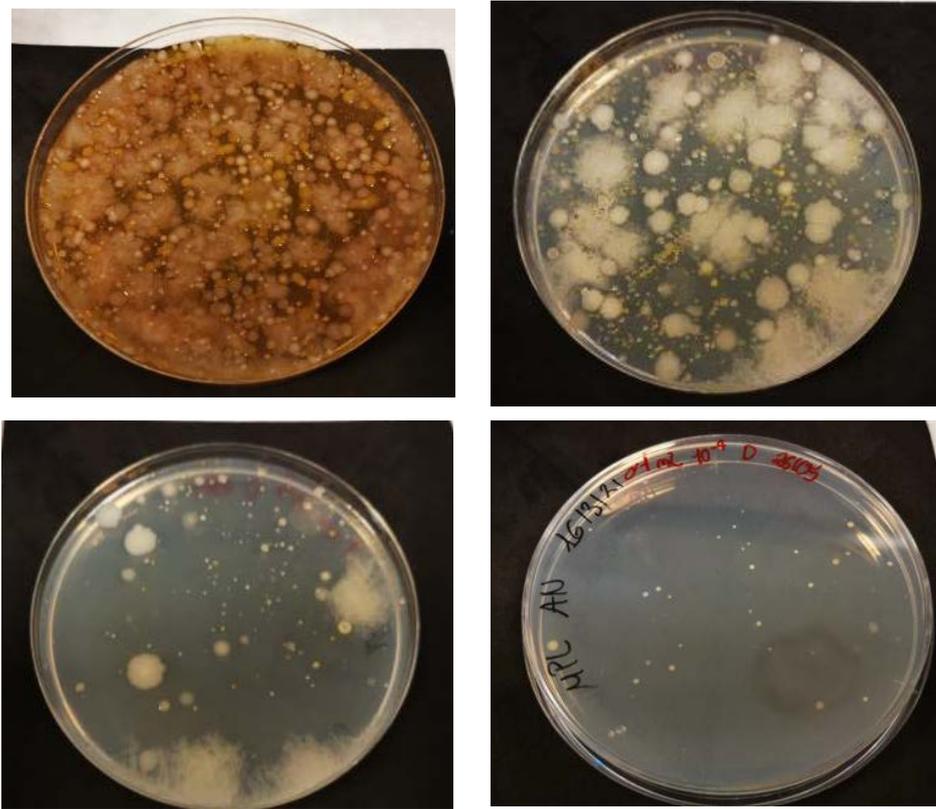


Figura 5 Una de las series de cultivos de 10^{-1} a 10^{-4} en placas Petri (se ven de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo)

En la placa en la que se sembró una de las diluciones 10^{-1} (figura 5, arriba a la izquierda), observamos un bajo número de actinomicetos que creaban halos de inhibición frente a las bacterias de su entorno natural pero que, al ser cultivados en la placa maestra resultaron no ser inhibidores de *E. coli* ni de *S. epidermidis*.

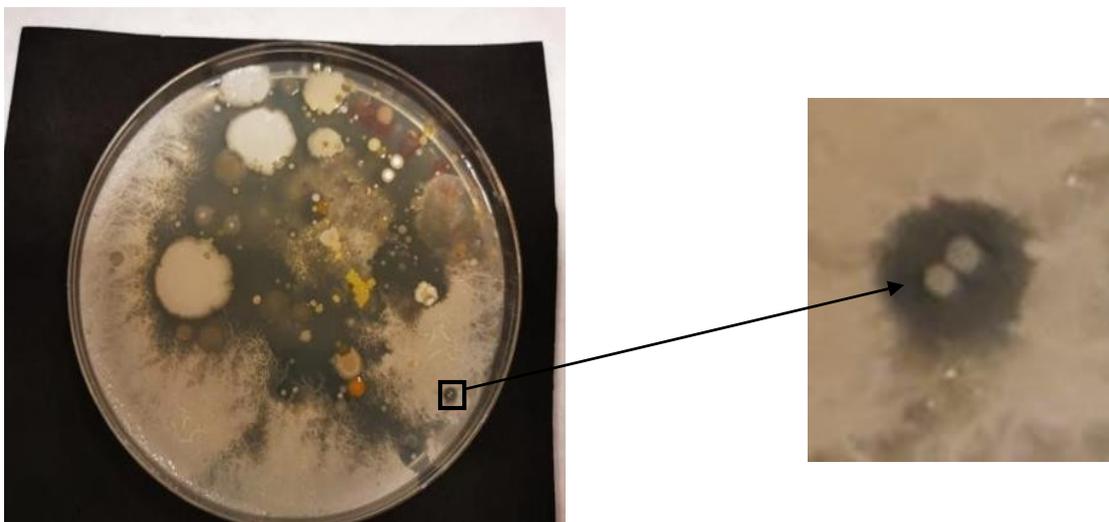


Figura 6 Placa donde se realizó la siembra de la dilución 10^{-2} . La ampliación se corresponde a una región donde las colonias muestran halo de inhibición.

En las placas donde se sembraron las diluciones 10^{-2} de las diferentes muestras, se observaron varias bacterias que crearon halos de inhibición remarcables, donde destacamos los halos marcados a la derecha de la figura 6 y la figura 7.

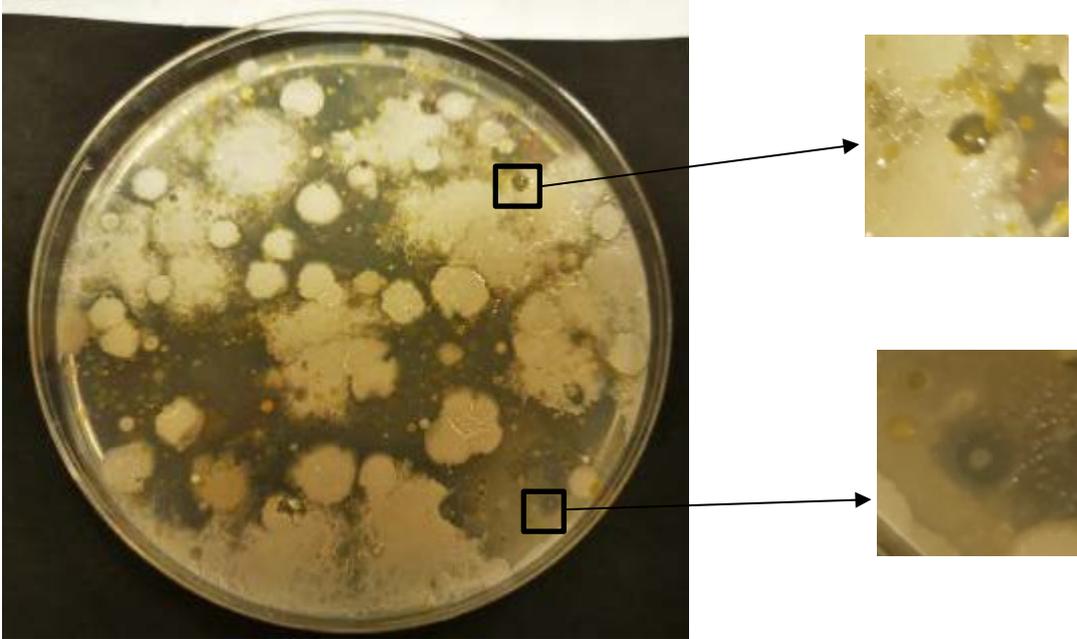


Figura 7 Placa de cultivo en la que se realizó la siembra de una dilución 10^{-2} . A su derecha hay dos ampliaciones de las zonas que se indican en la placa.

En las placas donde se sembraron las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , no se observaron halos de inhibición, debido al reducido número de colonias, como se pueden observar en los ejemplos expuestos en las figuras 8 y 9. Sin embargo, se distinguen mejor tanto las formas como las variedades de las distintas bacterias.

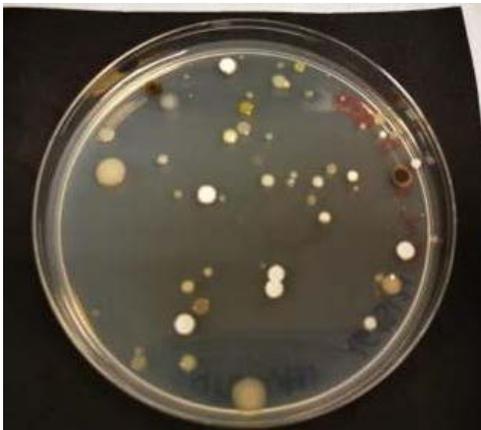


Figura 8 Placa donde se realizó la siembra de una dilución 10^{-3}

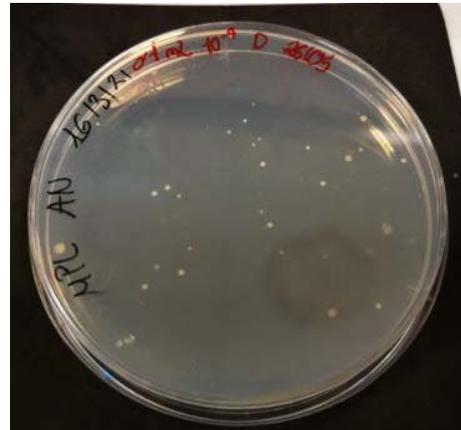


Figura 9 Placa donde se realizó la siembra de una dilución 10^{-4}

Las bacterias aisladas generaron halos de inhibición frente a una de las bacterias cuyo crecimiento se extendía fuera de su cuadrícula de la placa cultivada que llamamos placa maestra, tal y como se puede observar en la figura 10. Sin embargo, al enfrentarlás a las cepas testigo *E. coli* y *S. epidermidis* no se observó ningún tipo de halo de inhibición contra ninguna de las especies bacterianas testigo ensayadas. Las características fundamentales de las 25 colonias aisladas, y que fueron sembradas en la placa maestra, se muestran en la tabla 1 (Anexo).

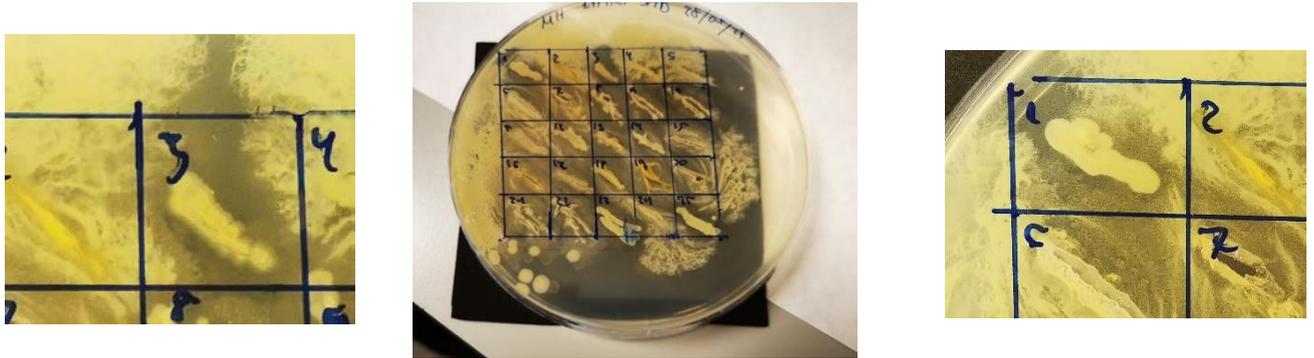


Figura 10 Placa maestra en la que se sembraron 25 colonias diferentes con dos ampliaciones a ambos lados

No se observó actividad antibiótica por parte de ninguna de las 25 colonias sembradas frente a las bacterias testigo (*E. coli* y *S. epidermidis*) (Figura 11) que se emplearon en este trabajo, como se indicó anteriormente. Quizás sea conveniente, como continuidad a este trabajo, recoger muestras de otros suelos diferentes y repitiendo la experimentación, intentar encontrar actividad antibacteriana frente a estas bacterias. Además, serviría para mejorar tanto el sistema de muestreo como el posterior tratamiento experimental.

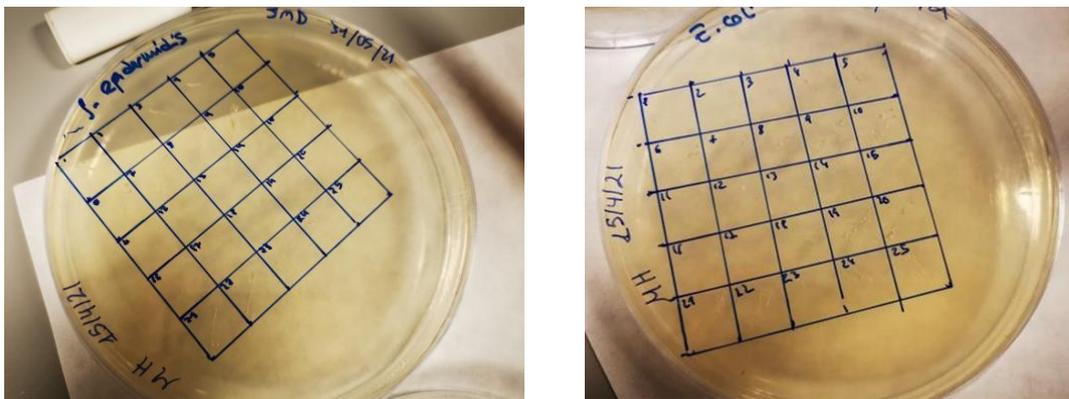


Figura 10 Placas donde se enfrentan las diferentes colonias sembradas a un césped de *S. epidermidis* (izquierda) y a uno de *E. coli* (derecha)

Recientemente se ha mostrado lo importante del desarrollo de la resistencia antibacteriana y el impacto real en la especie humana. De hecho, se estima que en el año 2019 fallecieron del orden de 4,95 millones de personas debido a la resistencia antibacteriana. Otras técnicas para combatir esta problemática se basan en el uso de bacteriófagos, los cuales debido a su actividad bactericida pueden mejorar el pronóstico de la sepsis provocada por bacterias resistentes.

Agradecimientos:

Queremos manifestar nuestro agradecimiento al IES Blanco Amor por habernos permitido llevar a cabo esta actividad en el ámbito STEMBach del bienio 20-22. Agradecemos a la Dra. María José Pérez y la Dra. Julia Carballo el abrirnos las puertas de su laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias de Ourense y guiarnos en la experimentación llevada a cabo en este trabajo. También deseamos agradecer al Dr. Francisco Boán por su inestimable guía y dedicación en la elaboración de este trabajo.

Bibliografía

- Sadurní, J.M. (2019). *Alexander Fleming, el padre de la penicilina*. National Geographic. Historia.
- Tricas, J. M. López (2019) *Ernst Chain y la penicilina*. <http://www.info-farmacia.com>.
- Madero, C. M. y Návoas, A. L. (2019-2020). *Plan Nacional frente a la resistencia de los antibióticos 2019-2020*. <https://www.resistenciaantibioticos.es> (Ministerio de Sanidad)
- Alós, J. I. (2015). *Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. **Vol. 33, nº10, págs. 162-169**.
- Organización Mundial de la Salud (2020). *Resistencia a los antibióticos*. Web oficial de la OMS (<https://www.who.int/es>)

- Murray, C. J. L. et al. (2022) *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. Lancet, **vol.399**, págs. **629-655**.
- Eskenazi, A. et al. (2022) *Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae**. Nature Communications, **vol.13**.
- Pernaute, L. y Jiménez, V. (2017) *Small World Initiative. Educando para combatir la Resistencia a los antibióticos*. Pharmatech (<https://www.pharmatech.es/>) nº **32**.

Anexo:

Muestra	Color	Forma de los bordes	Dilución de la que se obtuvo	Inhib. contra <i>E.coli</i> y <i>S.epidermidis</i>
1	blanco	circular	10 ⁻¹	no
2	amarillo	circular	10 ⁻¹	no
3	blanco	irregular	10 ⁻³	no
4	blanco	irregular	10 ⁻²	no
5	translúcida	irregular	10 ⁻²	no
6	blanca	circular	10 ⁻³	no
7	verde	circular	10 ⁻²	no
8	translúcido	circular	10 ⁻²	no
9	blanco	irregular	10 ⁻¹	no
10	blanco	circular	10 ⁻²	no
11	blanco	circular, bordes difusos	10 ⁻³	no
12	blanco	circular	10 ⁻³	no
13	naranja	circular	10 ⁻²	no
14	blanco	irregular	10 ⁻²	no
15	translúcida	irregular	10 ⁻²	no
16	naranja	circular	10 ⁻²	no
17	translúcida	circular	10 ⁻²	no
18	amarilla	circular	10 ⁻²	no
19	blanca	circular, bordes difusos	10 ⁻²	no
20	blanca	circular	10 ⁻²	no
21	blanca	circular, bordes difusos	10 ⁻²	no
22	amarilla	circular	10 ⁻¹	no
23	blanco	circular	10 ⁻¹	no
24	translúcido	irregular	10 ⁻³	no
25	blanco	circular	10 ⁻²	no

Tabla 1 Características básicas de las colonias aisladas en la placa maestra. Descripción de los resultados obtenidos en la placa maestra. El número de muestra se corresponde con cada una de las cuadrículas.