

Bacterias con Actividad Antimicrobiana aisladas del Suelo en el marco del Proyecto SWI@Spain

Bacteria with Antimicrobial Activity isolated from Soil within the frame of SWI@Spain Project

Alejandro García López y Paula San Segundo Lobato

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema global que afecta a toda la sociedad, estando en juego la vida de millones de personas y generando costes de miles de millones de dólares. Por ello, ahora más que nunca, se hace necesaria la búsqueda de nuevas soluciones que sean capaces de afrontar la RAM. En este contexto surge la “*Small World Initiative™*”, un proyecto internacional que consigue que estudiantes de todo el mundo aborden el problema de la RAM aplicando el método científico para la búsqueda de nuevos antibióticos, capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias estrechamente relacionadas con las bacterias multirresistentes o ESKAPE. En nuestro caso hemos realizado este estudio dentro del proyecto de innovación educativa SWI@Spain, financiado por el programa Innova. El suelo es una de las principales fuentes de los antibióticos que se utilizan hoy en día. Por ello, en nuestro trabajo se han aislado microorganismos del suelo y se ha estudiado su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas con las ESKAPE, valorando además el efecto de diversos factores ambientales, como la temperatura o el medio de cultivo, en la eficacia de estos ensayos. Todas las muestras de suelo analizadas presentaban alrededor de 10^7 UFC/g de tierra. Además hemos aislado un porcentaje estimable de bacterias que inhiben el crecimiento de aquellas estrechamente relacionadas con las ESKAPE.

Palabras clave: RAM, antimicrobianos, ESKAPE, bacterias del suelo, SWI@Spain.

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the global concerns that affects whole society. AMR endangers millions of people's lives and generates costs that raises to thousands of millions of dollars. Thus, now more than ever, the search for new solutions to confront AMR is totally necessary. In this context appears the *Small World Initiative™*, an international project that, in order to face the AMR problem, motivates students all around the world to participate in the search for new antibiotics capable to inhibit the growth of multiresistant bacteria, known as well as ESKAPE. In our case, we have carried out this essay within the educative innovation project SWI@Spain, which is funded by Innova program. Soil is one of the principal sources of the antibiotics that we are currently taken advantage of. Thus, in our study, microorganisms have been isolated from soil with the aim to study their ability to inhibit the growth of bacteria closely related to ESKAPE, valuating also the influence of some environmental factors, like temperature and culture medium, in the effectiveness of these experiments. Soil samples analyzed in our study contained around 10^7 UFC/g of soil. Moreover, we have isolated a sizable percentage of bacteria able to inhibit the growth of those ones closely related to ESKAPE bacteria.

Keywords: AMR, antimicrobial agents, ESKAPE, soil bacteria, SWI@Spain.

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es potencialmente el desafío médico más importante al que se enfrenta la humanidad en el s. XXI. Si no se toman medidas al respecto, entre hoy y el año 2050 el coste de la resistencia a antibióticos podría superar los 100.000 millones de dólares y suponer la muerte prematura de 300 millones de personas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015). A pesar de que la RAM ocurre de forma natural como consecuencia de la propia evolución de los microorganismos, el ser humano está acelerando este proceso. En este contexto, en los últimos años han surgido varias propuestas a nivel internacional y nacional, como el Plan Nacional frente a la Resistencia a Antibióticos en España, que pretenden resolver este problema.

Este es el principal marco en el que surge la “*Small World Initiative™*” (SWI), un proyecto innovador nacido en 2012 en la universidad de Yale (EEUU) concebido por la autora Jo Handelsman, cuyo objetivo es abordar el grave problema de la RAM, así como motivar a los estudiantes hacia la elección de un grado en Ciencias Experimentales. Para ello, estudiantes de todo el mundo recogen muestras de suelo, fuente principal de los antibióticos disponibles, de las que aíslan diversas bacterias y ensayan su actividad antimicrobiana frente a unos microorganismos (ESKAPE-like) estrechamente emparentados con aquellos que ya presentan fuertes resistencias, conocidos como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y diversas especies de *Enterobacter*).

Cuanto más ensayos de este tipo se realicen y mejores medidas frente a la RAM se tomen, más nos estaremos acercando hacia un futuro en el que la RAM deje de ser un problema y acabemos ganando la batalla a los microorganismos superresistentes.

Material y métodos

Seis muestras de suelo (denominadas desde CB1 a CB6) fueron recogidas de diferentes lugares en condiciones lo más asépticas posibles. De cada muestra se anotaron datos como la fecha de recolección, localidad, coordenadas geográficas, profundidad a la que la muestra fue recogida, tipo de suelo, condiciones meteorológicas y cualquier otra observación que resultara de interés.

De cada una de las muestras se hizo un banco de diluciones en placas con TSA (agar triptonsoja) al 10% y cicloheximida (15mg/ml). Las placas se incubaron a 20°C durante cuatro días. Con los resultados del crecimiento, se hizo el recuento de colonias (UFC/gramo) para cada una de las muestras de tierra.

De las colonias que crecieron en las diluciones, se escogieron 15 por cada muestra tierra para hacer los prime-

ros ensayos inhibición del crecimiento. Para estos ensayos se utilizaron dos medios, Mueller Hinton (MH) y TSA, y dos microorganismos ESKAPElike, *Acinetobacter baumannii* (Gram -) y *Bacillus sp* (Gram +). Para el césped de los microorganismos ESKAPE-like se preparó una solución de 0,5 Mc Farland y se extendió en las placas con un hisopo. Las colonias escogidas de las placas del banco de diluciones y un control positivo de antibiosis se sembraron sobre estas placas y en una placa control sin ESKAPE-like para su uso posterior. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Las colonias que produjeron un halo de inhibición en estos ensayos preliminares se seleccionaron y reaislaron por agotamiento de asa en placa en TSA, tras lo cual se conservaron a -80°C en glicerol al 20%.

Las bacterias seleccionadas se caracterizaron mediante la tinción de Gram y se inocularon en tres medios diferentes, MH, BHA (Agar cerebro-corazón) y TSA, que se incubaron a tres temperaturas diferentes, 20°C, 28°C y 37°C, con el objeto de elegir las condiciones más adecuadas para el segundo ensayo de inhibición del crecimiento.

Para el segundo ensayo se utilizó como medio TSA, temperaturas de incubación de 28°C y 37°C y los siguientes ESKAPE-like para el césped: *Bacillus subtilis* (CECT 39), *Escherichia coli* (CECT 515), *Kocuria rhizophila* (CECT 241), *Serratia marcescens* (CECT 159), *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Enterobacter aerogenes* (las tres últimas de la colección del departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM). Las lecturas de los ensayos se realizaron a 24 horas y a 48 horas.

Resultados

Recuento de colonias

Las seis muestras de tierra presentaban entre 1-4,5·10⁷ UFC/gramo.

Ensayos de antibiosis

En el primer ensayo de antibiosis, de las 90 colonias seleccionadas (15 colonias de cada una de las 6 muestras), 7 colonias (CB1-13, CB2-1, CB2-5, CB5-7, CB6-2, CB64 y CB6-12) fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Bacillus sp.* y 5 colonias (CB45, CB4-6, CB5-1, CB5-10 Y CB5-12) inhibieron tanto a *Bacillus sp.* como a *A. baumannii*. Estas 12 colonias fueron seleccionadas para el segundo ensayo de inhibición del crecimiento.

Para el segundo ensayo con las bacterias seleccionadas, se escogió como medio TSA y como temperaturas de incubación 28°C y 37°C. Los resultados del segundo ensayo se muestran en la Tabla 1. Los ESKAPE-like que mostraron más sensibilidad fueron *B. subtilis*, *S. saprophyticus*, *E. coli*, *K. rhizophila* y *P. fluorescens*.

	CB1-13		CB2-1		CB2-5		CB4-5		CB4-6		CB6-12	
	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
B.s.		*					#				*	
S.s.												
E.c.												
K.r.											***	
P.f.												
S.m.												
E.a.							*					

	CB5-1		CB5-7		CB5-10		CB5-12		CB6-2		CB6-4	
	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C	28°C	37°C
B.s.	***	##	**		***	#	***	#	#	*	*	*
S.s.			*	**					**	***	**	***
E.c.	**				***		**			*		**
K.r.	***	#	***		***	***	***		***	***	***	***
P.f.	**				##		**		**		**	
S.m.												
E.a.												

Tabla 1. En la primera columna se indican los ESKAPE-like utilizados: B.s. (*B. subtilis*), S.s. (*S. saprophyticus*), E.c. (*E. coli*), K.r. (*K. rhizophila*), P.f. (*P. fluorescens*), S.m. (*S. marcescens*) y E.a. (*E. aerogenes*). Los asteriscos (*) corresponden a la lectura de los resultados a 48 horas, siendo el número de asteriscos (1, 2 o 3) indicativo del tamaño relativo del halo de inhibición. Las almohadillas (#) corresponden a los resultados positivos en la lectura a 24 horas que no se han repetido en la lectura a 48 horas. Las colonias sombreadas en gris (CB5-1, CB5-7, CB5-10, CB5-12, CB6-2 y CB6-4) son aquellas cuyos resultados son los más destacables.

Tinciones de Gram

De las 12 colonias, 3 fueron por bacilos Gram positivos (CB1-13, CB6-2 y CB6-4), 8 bacilos Gram negativos (CB2-5, CB4-5, CB4-6, CB5-1, CB5-7, CB5-10, CB5-12 y CB6-12) y 1 cocos Gram positivos (CB2-1).

Discusión

La proporción de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de tierra es bastante similar en las seis muestras de tierra tomadas en diversos suelos de las Comunidades de Madrid y Castilla-La Mancha (del orden de 10^7 UFC/g de tierra), lo que podría indicarnos que el suelo tiene una capacidad de carga máxima para la cantidad de microorganismos que habitan en él. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras investigaciones, que indican que en los suelos de los bosques el número de procariontes en el primer metro de profundidad es de 4×10^7 células/g de suelo y entre 1-8 m de 10^6 células/g de suelo, dependiendo esta capacidad de carga, a su vez, del tipo de suelo en el que se lleve a cabo el muestreo (Whitman, Coleman y Wiebe, 1998). Es lógico pensar que, de tal amplia riqueza biológica bacteriana que habita en tan solo un gramo de tierra de una zona determinada, la probabilidad de encontrar al menos una especie capaz

de inhibir el crecimiento de otras bacterias es muy elevada. El suelo, por tanto, es una importante fuente de microorganismos potenciales productores de antibióticos de interés. Tal y como se observa en los resultados obtenidos, tres de las doce bacterias aisladas de cinco de las seis muestras de suelo inhibieron el crecimiento de un número considerable de estas bacterias ESKAPE-like.

Los antibióticos son compuestos químicos naturales sintetizados por microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Al ser compuestos del metabolismo secundario su síntesis va depender de una amplia gama de factores ambientales y, por ello en relación con nuestro trabajo, es interesante comparar el efecto que tienen las distintas condiciones ambientales sobre los ensayos de inhibición del crecimiento, para así determinar qué variables han de tenerse en cuenta para la posible obtención del compuesto de interés. En este trabajo sólo hemos estudiado el efecto de la temperatura y el medio de cultivo, pero se podrían haber estudiado muchas otras variables que aportaran información útil para la medida de este parámetro. Por lo general, se observa que los ensayos de inhibición del crecimiento funcionan con nuestros microorganismos aislados del suelo mejor a 28°C que a 37°C y su crecimiento fue mejor en TSA que en los otros dos medios empleados (BHA y MH).

Debido a la distinta composición de su pared celular, la inhibición del crecimiento de bacterias Gram negativas suele

ser más difícil que la de Gram positivas, siendo más inaccesible la pared celular de las primeras que la de las segundas. Por ello, el número de halos de inhibición observado en Gram negativas es menor que en Gram positivas, destacando las cinco colonias mencionadas en el apartado anterior como inhibidoras del crecimiento de ambos tipos de microorganismos.

Por último, sería interesante llevar a cabo ensayos frente a las bacterias ESKAPE, identificar los microorganismos más prometedores y comprobar si la inhibición del crecimiento que producen estos microorganismos se debe o no a la producción de un compuesto con acción antibiótica.

Conclusiones

Los suelos muestreados en este trabajo tienen una carga microbiana del orden de 10^7 UFC/g de tierra en el primer metro de profundidad.

Las mejores condiciones para realizar los ensayos de inhibición del crecimiento fueron: medio TSA a 28°C.

En este trabajo se han aislado bacterias de distintos suelos de las Comunidades de Madrid y Castilla-La Mancha ca-

paces de inhibir el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas con las ESKAPE.

La inhibición del crecimiento frente a los microorganismos ESKAPE-like Gram positivos es mayor que frente a los Gram negativos destacando, sin embargo, tres colonias de los microorganismos aislados en este trabajo capaces de inhibir el crecimiento tanto de algunos ESKAPE-like Gram positivos como Gram negativos.

Referencias

- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95, 6578–6583. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- World Health Organization (WHO) (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1