

Estudio de actividades antimicrobianas en cepas aisladas de sedimentos marinos antárticos

Study of antimicrobial activities in strains isolated from Antarctic marine sediments

JAVIER VICENTE SÁNCHEZ, ALEJANDRO ALONSO CONDE,
DOMINGO MARQUINA DÍAZ

Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología. Facultad de
Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid

javievic@ucm.es

Resumen: Las adaptaciones desarrolladas por los microorganismos antárticos frente a las extremas condiciones a las que se encuentran sometidos hacen que estos sean considerados como una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos.

Se realizaron ensayos de antibiosis con cepas bacterianas y fúngicas aisladas en una muestra de sedimentos marinos procedentes de Isla Decepción, Antártida. A estos, se han sumado ensayos de antibiosis frente a bacterias tipo de laboratorio. Los resultados reflejan que son los hongos las potenciales fuentes de nuevos antimicrobianos.

Además, se estudiaron los antibiogramas de las cepas antárticas frente a antibióticos de uso clínico. Los resultados sobre resistencias que se obtengan en este estudio podrían servir como punto de partida para conocer el grado de impacto de origen antrópico en la resistencia a antibióticos. A la vista de los resultados, podemos decir, que la mayor parte de las cepas de nuestro estudio son cepas resistentes a los antibióticos empleados.

Abstract: The adaptations developed by Antarctic microorganisms facing the extreme conditions to which they are subjected make them considered to be a potential source of new antimicrobial agents.

Antibiosis essays were performed on bacterial and fungal strains isolated in a sample of marine sediments from Deception Island, Antarctica. To these, antibiosis essays against laboratory type bacteria have been added. The results reflect that fungi are the potential source of new antimicrobials. In addition, the antibiograms of Antarctic strains were studied against antibiotics for clinical use. The results on resistance obtained in this study could serve as a starting point to know the degree of anthropogenic impact

on antibiotic resistance. In view of the results, we can say that most of the strains of our study are resistant to the antibiotics used.

Palabras clave: antibióticos, resistencias, antibiosis, Antártida, Isla Decepción

Keywords: antibiotics, resistances, antibiosis, Antarctica, Deception Island

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se está especial hincapié en el incremento de microorganismos patógenos multirresistentes a los antibióticos utilizados tradicionalmente. La Antártida, es uno de los últimos territorios inexplorados, donde la presencia humana ha sido y es escasa o nula, por lo que resultaría extraño encontrar resistencias. Por tanto, podemos hablar de la Antártida como una fuente potencial de nuevos compuestos activos para el control de microorganismos patógenos.

En trabajos anteriores realizados por nuestro grupo (pendientes de publicación) se aislaron diferentes cepas bacterianas y fúngicas a partir de una muestra de sedimentos marinos procedentes de Isla Decepción. Dichas cepas fueron identificadas por métodos moleculares. El interés de estos aislamientos radica en determinar el perfil de resistencia y/o sensibilidad, tanto a la producción de nuevos antibióticos como a la sensibilidad frente a antibióticos empleados tradicionalmente en clínica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Aislamiento e identificación de microorganismos antárticos.*

Para el presente estudio se emplearon las cepas bacterianas (Figura 1) y fúngicas (Figura 2) obtenidas por técnicas de aislamiento tradicional a partir de una muestra tomada en la Celda de Precipitación Hidrotermal N°2 colocada en la campaña HYDRO-DEC-2000 (Acción Especial ANT1998-1557-E/HESP) en Isla Decepción, Islas Shetland del Sur, Antártida (60° 34' 9.300" W 62° 58' 48.30" S). Las cepas se identificaron por técnicas moleculares, empleándose las secuencias ribosomales codificantes para la subunidad 16S del ribosoma en bacterias, y la secuencia ITS en hongos filamentosos y levaduras.

| | | | | | |
|-------|---------------------|--------|----------------------------|--------|--------------------------|
| DIP-1 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-10 | <i>Bacillus cereus</i> | DIP-19 | <i>Bacillus sp.</i> |
| DIP-2 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-11 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-20 | <i>Bacillus sp.</i> |
| DIP-3 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-12 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-21 | <i>Bacillus mycoides</i> |
| DIP-4 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-13 | <i>Bacillus megaterium</i> | DIP-22 | <i>Bacillus simplex</i> |
| DIP-5 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-14 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-23 | <i>Bacillus sp.</i> |
| DIP-6 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-15 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-24 | <i>Bacillus sp.</i> |
| DIP-7 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-16 | <i>Bacillus simplex</i> | DIP-25 | <i>Bacillus sp.</i> |
| DIP-8 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-17 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-26 | <i>Bacillus sp.</i> |
| DIP-9 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-18 | <i>Bacillus sp.</i> | DIP-27 | <i>Bacillus sp.</i> |

Figura 1. Cepas bacterianas de origen antártico identificadas por técnicas moleculares empleadas en los ensayos.

| | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------------------------------|
| DIF-1 | <i>Aspergillus sp.</i> | DIF-6 | <i>Penicillium sp.</i> |
| DIF-2 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | DIF-7 | <i>Penicillium sp.</i> |
| DIF-3 | <i>Aspergillus sp.</i> | DIF-8 | <i>Penicillium crustosum</i> |
| DIF-4 | <i>Aspergillus sydowii</i> | DIF-9 | <i>Exophiala sp.</i> |
| DIF-5 | <i>Penicillium sp.</i> | DIF-10 | <i>Penicillium chrysogenum</i> |

Figura 2. Cepas fúngicas de origen antártico identificadas por técnicas moleculares empleadas en los ensayos.

2.2. Ensayo de actividades antimicrobianas.

Como bacterias sensibles para estos ensayos se emplearon cepas de la colección del Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid: *Escherichia coli* (ECOL), *Salmonella sp.* (SALM), *Pseudomonas aeruginosa* (PAER), *Enterobacter aerogenes* (EAER), *Enterococcus faecium* (EFAE), *Pseudomonas fluorescens* (PFLU), *Bacillus subtilis* (BSUB), y *Staphylococcus aureus* (SAUR).

Para los ensayos de antibiosis se emplearon discos de antibiograma (Oxoid, Thermo Scientific®) con una cantidad de antibiótico conocida: ampicilina, 10 µg (AMP10); estreptomycin, 10 µg (S10); cotrimoxazol, 25 µg (SXT25); vancomicina, 30 µg (VA30); gentamicina, 10 µg (CN10); ácido nadilíxico, 30 µg (NA30); eritromicina, 15 µg (E15); y ciprofloxacina, 10 µg (CIP10). Se clasificó a los organismos en sensibles, tolerantes o resistentes en función del

radio del halo de inhibición provocado por cada uno de los antibióticos estudiados.

Para los ensayos con bacterias se empleó *SeaWater-Yeast-Peptone* modificado (por litro): extracto de levadura (3 g), proteosa peptona (5 g), sal marina para acuarios (30 g), agar europeo (15 g). Para los ensayos con hongos el citado medio se enriqueció con dextrosa (10 g). Los medios fueron autoclavados a 121°C durante 21 minutos y posteriormente plaqueados. Como diluyente para preparar suspensiones bacterianas se utilizó suero salino al 0,9% de NaCl.

En todos los casos se realizó una siembra en césped a partir de una suspensión bacteriana 1,0 en la escala McFarland. Sobre el césped se dispusieron los discos de antibiótico con las cargas arriba indicadas, secciones de 5 mm de diámetro de un cultivo de hongos previo, o una cantidad de biomasa bacteriana según correspondía. Todos los ensayos se incubaron a 32°C determinando los halos de inhibición a las 24, 48 y 72 horas.

3. RESULTADOS

De los 182 ensayos de antibiosis realizados entre las bacterias antárticas con las bacterias tipo ninguno mostró una inhibición significativa del crecimiento. De los 702 ensayos realizados entre bacterias antárticas, únicamente 17 presentaron algún tipo de inhibición. Los aislamientos DIP-16 y DIP-21 fueron los que mostraron un mayor número de inhibiciones de crecimiento frente a cepas antárticas (6 y 7 respectivamente). DIP-25 produjo la inhibición de crecimiento de 2 cepas antárticas, y DIP-10 y DIP-11 tan solo de una. El resto no presentaron inhibición del crecimiento.

Los resultados más significativos fueron los obtenidos con las cepas hongos filamentos aislados. Se realizaron 80 cruces con las distintas bacterias tipo, de los que 8 presentaron inhibición del crecimiento. DIF-1 fue el hongo que más número de inhibiciones produjo (3), el resto fueron provocadas por: DIF-10 (2), DIF-2, DIF-5 y DIF-6 (1).

Centrándonos en los ensayos de inhibición entre hongos filamentosos y cepas bacterianas antárticas (270 cruces) (Figura 3), 51 presentaron inhibición del crecimiento. DIF-7 y 8, fueron las cepas fúngicas que mayor número de inhibiciones provocaron, 11 cada una de ellas. El resto de las inhibiciones fueron provocadas

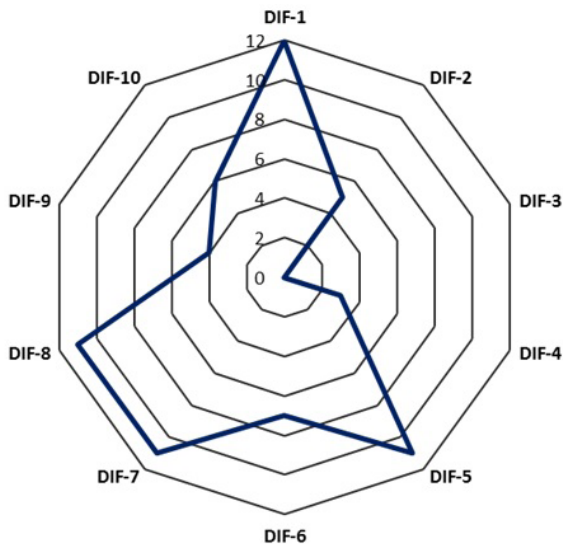


Figura 3. Número de halos producidos por las cepas fúngicas antárticas frente a cepas bacterianas antárticas.

por: DIF-5 (10), DIF-1 (9), DIF-6 (6), DIF-3, DIF-9 y DIF-10 (4), y DIF-4 (3).

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos con hongos, observados de una manera global y de acuerdo al número total de halos que producen, podemos apreciar que las cepas fúngicas que producen un mayor nivel de inhibición del crecimiento bacteriano, en orden decreciente son: DIF-1 (12), DIF-5, 7 y 8 (11), DIF-6 (7), DIF-10 (6), DIF-2 (5), DIF-9 (4) y DIF-4 (3).

Por otro lado, al estudiar las resistencias/sensibilidades de las cepas bacterianas antárticas a los antibióticos de uso clínico (Figura 4), podemos inferir que existe una elevada proporción de resistencias, 15 de las 24 cepas empleadas en el estudio presentan resistencias a todos los antibióticos estudiados. Únicamente la cepa (DIP-27) presenta sensibilidad a 6 de los 8 antibióticos empleados.

Todas las cepas bacterianas antárticas resultaron resistentes al ácido nadilíxico (24 de 24); mientras que, en el polo opuesto, el antibiótico que presentó más sensibilidades fue la ampicilina (7 de 24).

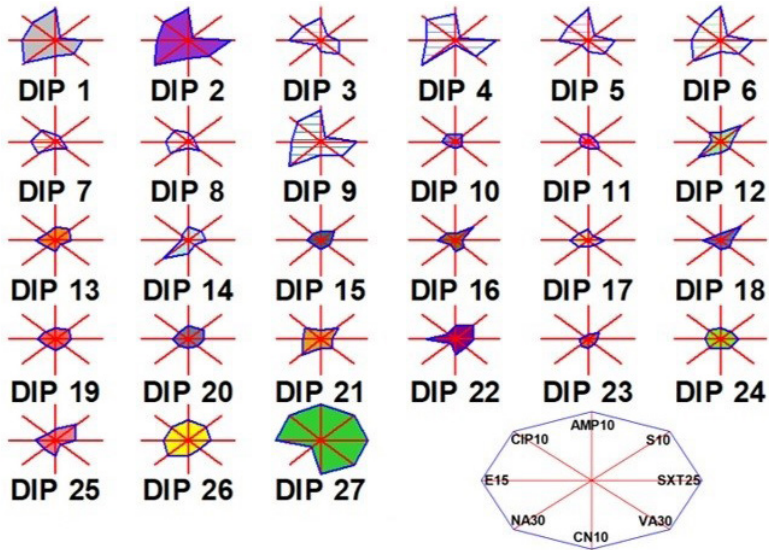


Figura 4. Diagramas de rayos y estrellas para la caracterización de las cepas bacterianas en función de las resistencias a los antibióticos de uso clínico empleados.

4. DISCUSIÓN

Onofri *et al.* (2009) ya habían puesto de manifiesto la presencia de hongos procedentes de suelos antárticos que inhibían el crecimiento de algunas cepas tipo como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. En nuestro caso no se ha observado la inhibición del crecimiento de *E.coli*, pero sí de *B.subtilis* (cepas de laboratorio). Destacar que la proporción en el número de halos originados por los hongos frente a cepas bacterianas es menor cuando cruzamos las cepas tipo que cuando empleamos cepas antárticas (10 y 18,88 % respectivamente). En este caso, la explicación más plausible es la pertenencia al mismo hábitat, las cepas fúngicas han ido evolucionando a aquellas con capacidad de reducir sus competidores en el medio. De la misma manera explicamos los resultados obtenidos en el estudio de las cepas tipo frente a las antárticas, la diferencia de hábitat implica que no se hayan desarrollado mecanismos de competencia frente a las especies tipo.

La Antártida es un ambiente con unas condiciones extremas, el hábitat se mantiene estable a lo largo del tiempo, sin apenas cambios. Los microorganismos que allí habitan están adaptados de una manera extrema a esas condiciones. La presencia de competencia

entre especies bacterianas de un mismo hábitat (o cepas diferentes de una misma especie) entre sí puede considerarse nula, algo que aparece de forma significativa en nuestro estudio. Los ensayos de antibiosis entre bacterias antárticas entre sí, apenas produjo algunas inhibiciones del crecimiento (2,42% de los cruces presentaron halo). La presencia de inhibiciones del crecimiento de hongos filamentosos antárticos sobre bacterias antárticas es bastante abundante (Yogabaanu *et al.*, 2017).

Analizando los resultados obtenidos en el ensayo de bacterias tipo con los hongos antárticos, se observa que la mitad de las inhibiciones provocadas por los hongos filamentosos fueron sobre la cepa de *B.subtilis* (4 halos). Todas nuestras cepas bacterianas antárticas identificadas forman parte del género *Bacillus*, por lo que podríamos considerar la presencia de una competencia interespecifica con este género bacteriano.

La zona de origen de la muestra es una zona inexplorada, donde, la posibilidad de que se ejerza una presión selectiva exógena o de origen antrópico sobre la microbiota allí establecida es mínima. No obstante, alrededor del 80% de los estudios de antibiosis indican resistencia a los antimicrobianos. Van Goethem *et al.* (2018) ha descrito a los suelos antárticos como un posible reservorio de genes de resistencia a antibióticos

No obstante, cabe destacar que las cepas pertenecen todas ellas a un mismo ambiente en el que interactúan unas con otras, pudiéndose dar fenómenos de transferencia horizontal, explicación plausible a la uniformidad de las resistencias en este ambiente (Goldstein *et al.*, 2007) o simplemente se han conservado por transferencia vertical. Recaltar que las cepas proceden de sedimentos marinos, y destacar que las bacterias resistentes son aún más frecuentes en ambientes acuáticos (Kümmerer, 2009).

En estudios previos se ha observado que la ampicilina era efectiva contra bacterias antárticas (Tomova *et al.* 2015); en nuestro caso la ampicilina ha sido el antibiótico al que más sensibilidad han presentado nuestras cepas. A la vista de estos resultados, y considerando que se trata de un antimicrobiano de origen semisintético, se abre una puerta a posteriores investigaciones.

5. CONCLUSIONES

1. Existe una baja competencia entre las cepas bacterianas aisladas en el ambiente antártico (al menos las presentes en nuestra muestra).

2. Se observa un mayor efecto inhibitorio de los hongos filamentosos sobre las bacterias de su hábitat que de estos sobre bacterias de colección.

3. Las sustancias inhibitoras del crecimiento producidas por los hongos parecen afectar a la mayor parte de las bacterias antárticas del género *Bacillus*.

4. El número de resistencias a antibióticos de uso clínico (empleados en este ensayo) en bacterias antárticas es muy elevado, hecho que resulta extraño debido a la baja exposición a antibióticos clínicos en ese ambiente.

5. Este estudio crea excelentes perspectivas para la búsqueda de nuevas cepas antárticas como fuente de agentes antimicrobianos desconocidos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Martínez-Frías, Profesor de Investigación del Instituto de Geociencias, IGEO, por facilitarnos la muestra procedente de Isla Decepción, Antártida.

BIBLIOGRAFÍA

- Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*. 75(4): 435-441.
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lazarkevich, I. and Vasileva-Tonkova, E. 2015. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. *Frontiers in Life Science*. 8(4): 348-357.
- Onofri, S., Fenice, M., Cicalini, A., Tosi, S., Magrino, A., Pagano, S., Selbmann, L., Zucconi, L., Vishniac, H., Ocampo-Friedmann, R. and Friedmann, E., 2000. Ecology and biology of microfungi from Antarctic rocks and soils. *Italian Journal of Zoology*. 67(sup1):163-167.
- Van Goethem, M., Pierneef, R., Bezuidt, O., Van De Peer, Y., Cowan, D. and Makhallanyane, T., 2018. A reservoir of ‘historical’ antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*. 6(1):40. doi: 10.1186/s40168-018-0424-5.
- Yogabaanu, U., Weber, J., Convey, P., Rizman-Idid, M. and Alias, S., 2017. Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi. *Polar Science*. 14: 60-67.