

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS FILAMENTOSAS AISLADAS DE BOSQUES NATIVOS Y DE HUERTOS CASEROS

Osorio-Echeverri Víctor-Manuel, Arbeláez-Gálvis Lina, Correa-Gómez Elizabeth  
Grupo Biociencias. I.U. Colegio Mayor de Antioquia.

## RESUMEN

Cada vez es mayor el número de microorganismos resistentes a antibióticos. Esta resistencia aumenta debido al mal uso de los antibióticos existentes y al poco desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos por parte de la industria farmacéutica. Muchos de los antibióticos son producidos por microorganismos del género *Streptomyces* y por otras bacterias filamentosas Gram positivas. Estas se encuentran en el suelo, asociadas o no a las raíces de algunas plantas. En este trabajo se evaluaron ocho sitios de muestreo diferentes y en cinco de ellos, principalmente rizósferas de cultivos en huertos caseros, se lograron recuperar 19 aislamientos de bacterias filamentosas que inhibieron el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas con o sin resistencia reportada a algún antibiótico. Uno de los aislados nativos, S1H, mostró antagonismo contra los siete testigos evaluados. Diez aislados presentaron antagonismo solo contra bacterias Gram positivas, tres solo contra bacterias Gram negativas y seis contra Gram positivas y Gram negativas simultáneamente. Los diferentes perfiles de actividad pueden indicar la producción de moléculas antimicrobianas con diversos mecanismos de acción.

## PALABRAS CLAVES

*Streptomyces*, compuestos antibacterianos, aislados nativos

## INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 y la introducción de las sulfonamidas en 1938 hasta finales de la década de 1950, fueron desarrollados la mayoría de los antibióticos conocidos actualmente. Algunos como las penicilinas y las cefalosporinas inhiben la síntesis de la pared bacteriana, otros como los lipopéptidos y las polimixinas alteran la membrana citoplasmática, los aminoglucósidos y los anfenicoles inhiben la síntesis de proteínas y las quinolonas alteran la estructura de los ácidos nucleicos (1). De esta manera, la existencia de diferentes mecanismos de acción de los antibióticos se relaciona con la diversidad y la morfología de las bacterias causantes de enfermedades.

Muchos antibióticos se obtienen a partir de microorganismos como hongos y bacterias aunque las principales productoras naturales de compuestos antimicrobianos son las bacterias filamentosas Gram positivas del género *Streptomyces*. Al igual que otros actinomicetos, las bacterias de este género están presentes en muchos ambientes pero, a diferencia de otras, *Streptomyces* presenta un desarrollo multicelular complejo en el que a partir de sus esporas germinativas se forman filamentos que conllevan a un micelio aéreo multinuclear, con septos a intervalos regulares que permiten la creación de cadenas de esporas uninucleadas (2).

Especies como *S. rimosus*, *S. alboflavus*, *S. aureofaciens* y *S. vendagensis* productoras de tetraciclinas han sido aisladas de suelos en zonas urbanizadas e industrializadas (3). Otras especies como *S. griseus*, *S. clavuligerus*, *S. venezuelae*, *S. orientalis* y *S. kanamyceticus* productoras de estreptomycin, cefalosporinas, cloranfenicol, vancomicina y kanamicina, respectivamente, también se han encontrado en diferentes suelos (2,4–8). De igual forma, a partir

de la rizósfera de plantas, suelos destinados a la agricultura, suelos de bosques nativos y sedimentos de lagos se han obtenido aislados compatibles con el género *Streptomyces* que han mostrado actividad antibacteriana (9–11) asociada a la producción de compuestos ya reportados o a otros aún no caracterizados.

Históricamente, el uso de los antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos ha sido acompañado por la aparición de cepas microbianas resistentes. Algunas bacterias, por ejemplo, producen enzimas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas, otras expulsan los agentes antimicrobianos a través de proteínas de membrana denominadas bombas de eflujo y otras pueden modificar el sitio de unión del antibiótico impidiendo la acción de este (12,13). La resistencia antimicrobiana en las últimas décadas se ha convertido en una amenaza para los tratamientos contra las infecciones causadas principalmente por bacterias y hongos. A nivel mundial, esta resistencia a los agentes antimicrobianos representa un reto de salud pública pues al reducirse las opciones de agentes efectivos para el control de dichos microorganismos se incrementa la mortalidad o la duración de la enfermedad de los pacientes lo que puede costarle a los sistemas de salud hasta el 1.6% del Producto Interno Bruto en todo el mundo (14).

Desde la década de los 60, la velocidad en que se viene incrementando la cantidad de antibióticos descubiertos e introducidos en el mercado es menor que la velocidad a la que está aumentando la resistencia a antibióticos (12). Esto ha impulsado numerosas investigaciones que en la actualidad buscan encontrar nuevos organismos productores de antibióticos o desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos que permitan enfrentar el aumento en dicha resistencia.

Preocupada por esta problemática, la Organización Mundial de la Salud en 2017 publicó la lista de bacterias para las cuales se requieren antibióticos de manera urgente la cual incluye a las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y a las resistentes a carbapenem, a *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina y meticilina, *Streptococcus pneumoniae* no susceptible a penicilinas, entre otros (15). Además, como uno de sus objetivos para enfrentar la resistencia a los antibióticos, plantea impulsar políticas de inversión para el desarrollo de nuevas medicinas antimicrobianas considerando que en el mundo la incorporación de nuevos antibióticos está amenazada por el temor a que rápidamente se generen nuevas resistencias lo que hace menos atractiva la inversión en este campo para las industrias farmacéuticas (16).

En Colombia, las investigaciones para el desarrollo de nuevos antibióticos se ven respaldadas por políticas públicas como la Política Farmacéutica Nacional de 2012 en la que se impulsa la adecuación de la oferta de medicamentos a las necesidades de salud del país al considerar el estímulo a la investigación, el desarrollo y la producción de medicamentos mediante convocatorias entre diferentes instituciones, articuladas con otras políticas como la Nacional para la Gestión Integrada de la Biodiversidad y los Servicios Ecosistémicos (17).

Con el fin de establecer protocolos para la obtención y posterior purificación y evaluación de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias filamentosas, es necesario contar con microorganismos, principalmente del género *Streptomyces*. En este trabajo se muestra el resultado del aislamiento de este tipo de bacterias a partir de diferentes suelos de la región lo que ha permitido además explorar parte de la microbiota de diferentes suelos del municipio de Medellín.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de las muestras

Las muestras se tomaron en varias zonas del corregimiento de Santa Elena, municipio de Medellín, Colombia, a una temperatura promedio de 25°C. Se seleccionaron para el muestreo el suelo al lado de un sendero en un bosque nativo y las rizósferas de un cerco vivo, de un bosque nativo y de cultivos caseros de heliconias, aguacate, mora y col. Las muestras se tomaron a una profundidad de entre 10 y 20 cm y se transportaron refrigeradas en bolsas con cierre hermético hasta el laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud, IUCMA.

### Aislamiento de bacterias filamentosas

De cada muestra se resuspendieron 2 g en 200 ml de agua peptonada al 0.1% p/v y se mantuvieron en agitación por 30 minutos a 150 rpm, a 30°C. Las mezclas se dejaron sedimentar y se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  en agua peptonada. Se sembraron por superficie 100  $\mu$ l de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de manera homogénea en agar *Streptomyces* (HiMedia, Mumbai) y en agar caseína nitrato almidón (19), ambos medios suplementados con 2.5  $\mu$ g/ml de rifampicina. Las placas fueron incubadas a 28°C durante siete días o hasta que se diera la formación de colonias. Se seleccionaron colonias representativas para realizarles una tinción Gram y aquellas correspondientes a bacterias filamentosas Gram positivas se subcultivaron en agar *Streptomyces* hasta obtener aislados puros. Se conservaron estos aislados en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con 15% v/v de glicerol, a -20°C, a partir de colonias que presentaran micelio aéreo abundante.

### Pruebas de antagonismo *in vitro*

Para determinar la actividad antibacteriana de los aislados puros obtenidos, se utilizaron como microorganismo testigo tres bacterias Gram positivas: un aislado nativo de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y un aislado clínico de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y cuatro Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 700891, un aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*, uno de *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y uno de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasas (KPC). Estos microorganismos fueron reactivados en agar Luria Bertani (20) e incubados a 37°C durante 24 horas. Para los ensayos de actividad se prepararon suspensiones bacterianas en agua peptonada con una concentración correspondiente a un patrón McFarland 0.5.

Se prepararon suspensiones celulares de cada aislado nativo de bacterias filamentosas por resuspensión de colonias en agua peptonada con Tween 80 al 0.1% v/v. Cada una de estas se inoculó en agar Mueller Hinton (Merck, Darmstadt) por medio de una estría en el centro de la caja. Después de 5 o 10 días de incubación a 30°C, se inocularon las suspensiones de los microorganismos testigo formando una estría perpendicular y se incubaron nuevamente los medios durante 24 horas a 37°C. Se analizaron los antagonismos por determinación cualitativa de la zona de inhibición.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 44 aislados consistentes con *Streptomyces* a partir de las ocho muestras de suelo (Tabla 1). Algunos de los aislamientos presentaron colonias con morfologías similares pero por ser provenientes de sitios de muestreo diferentes se incluyeron para los análisis.

Tabla 1. Número de aislamientos compatibles con *Streptomyces*

Sitio de muestreo	Aislamientos	Código
Suelo sendero bosque nativo	1	S1C
Suelo bosque nativo	2	S1D, S2D
Rizósfera de cerco vivo	12	S1H, S2H, S3H, S4H, S5H, S6H, S7H, S8H, S10H, S11H, S13H, S17H
Rizósfera de bosque nativo	2	S1A, S2A
Rizósfera cultivo heliconias	7	S1B, 2SB, S3B, S3B-2, S4B, S5B, S6B
Rizósfera cultivo aguacate	12	S1E, S2E, S3E, S4E, S5E, S6E, S7E, S8E, S10E, S11E, S12E, S13E
Rizósfera cultivo mora	5	S1F, S2F, S3F, S4F, S7F
Rizósfera cultivo col	3	S1G, S1G-2, S3G

Los sitios de muestreo a partir de los cuales se obtuvieron más aislamientos de bacterias filamentosas fueron las rizósferas del cerco vivo y del cultivo de aguacate. Los suelos del cerco vivo han sido suplementados con fertilizantes orgánicos lo que representa una fuente de nitrógeno adicional para el crecimiento de *Streptomyces*. El cultivo de aguacate tenía árboles en producción lo que implica un mayor tiempo de establecimiento de diferentes comunidades microbianas en su rizósfera en comparación a los otros cultivos con menor tiempo de crecimiento. La rizósfera del bosque nativo, en cambio, presentó un pH menor y una humedad superior, condiciones que favorecen el crecimiento de otras bacterias como bacilos Gram positivos.

En la Figura 1 se muestran algunas morfologías macroscópicas en agar *Streptomyces* de las bacterias filamentosas aisladas. Inicialmente, la mayoría de las colonias eran lisas, brillantes y duras pero después de cinco a siete días de incubación a temperatura ambiente, se presentaba un micelio aéreo seco aterciopelado o pulverulento, que permitía diferenciar los aislados según el color y la forma. Algunos aislados produjeron pigmentos oscuros que se difundieron en el medio.

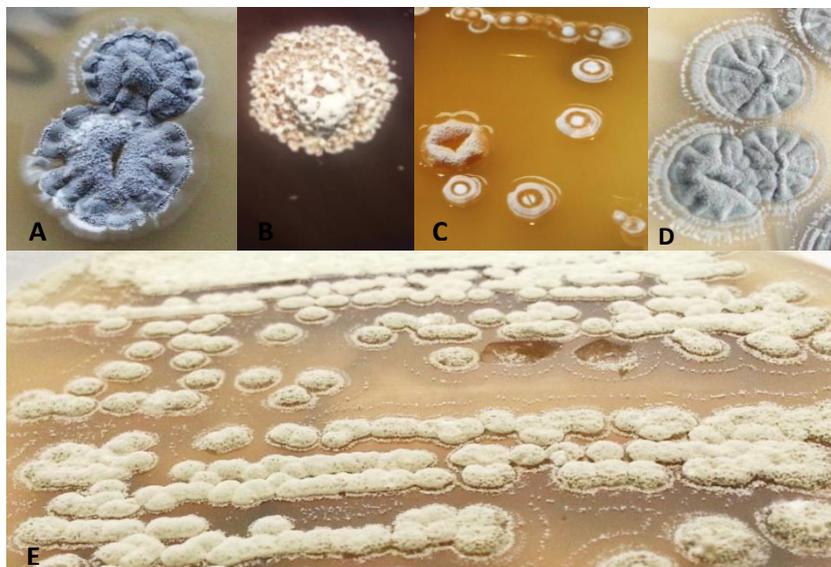
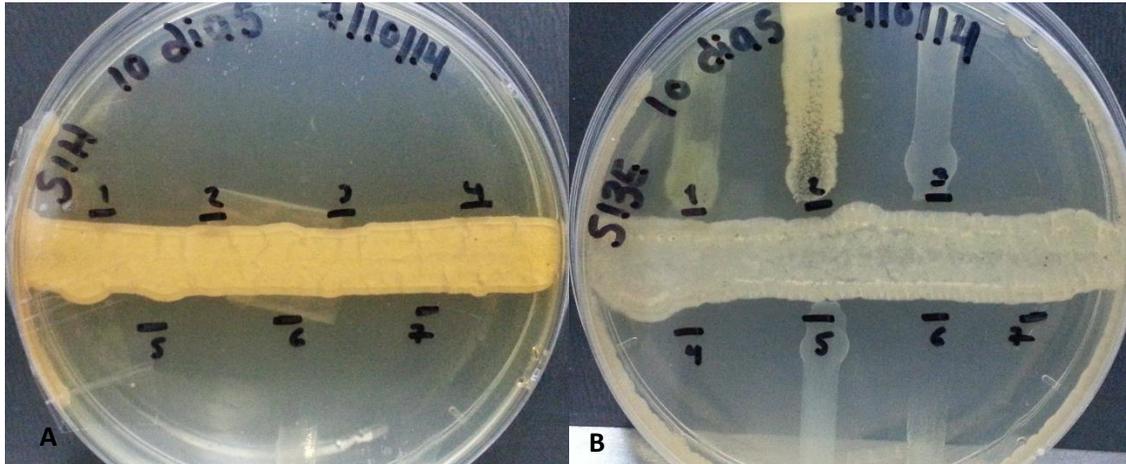


Figura 1. Colonias de algunas bacterias filamentosas en agar *Streptomyces*. (A) S8E, (B) S7F, (C) S1G, (D) S4H, (E) S1H.

A todos los aislados obtenidos se les verificó la actividad antagonista por medio de estrías perpendiculares (Figura 2). Se consideró que existió antagonismo (+) cuando la estría del microorganismo testigo iniciaba su crecimiento por lo menos a 5 mm de distancia de la estría de la bacteria filamentosa y que no hubo antagonismo (-) cuando se evidenció el crecimiento del testigo a menos de 5 mm. En algunos casos, la inhibición del testigo no fue completa ( $\pm$ ) aunque se vio una disminución del crecimiento cerca a la estría de la bacteria filamentosa o una estría translúcida característica de un crecimiento bacteriano disminuido.



**Figura 2.** Ensayo de antagonismo por estrías perpendiculares. (A) S1H, (B) S13E. Microorganismos testigo: 1. *P. aeruginosa*, 2. *B. subtilis*, 3. *S. aureus* ATCC 29213, 4. *E. coli* ATCC 700891, 5. MRSA, 6. KPC, 7. *E. coli* BLEE. Se reportan como (+) el antagonismo de S1H contra todos los testigos y el de S13E contra *E. coli* ATCC 700891, KPC y *E. coli* BLEE; (-) el antagonismo de S13E contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y MRSA; ( $\pm$ ) el antagonismo de S13E contra *B. subtilis*.

Los resultados de las pruebas de antagonismo se pueden ver en la Tabla 2. Solo se muestran los aislados nativos que presentaron actividad contra alguno de los testigos evaluados. De los aislados obtenidos, 19 presentaron algún tipo de actividad contra al menos uno de los testigos evaluados. Solo el aislado S1H mostró inhibición de todos los testigos. Por el contrario, los aislados S1C, S6E, S7E, S4H y S8H presentaron actividad solo contra *B. subtilis*, siendo este el testigo inhibido por el mayor número de aislados nativos (14 en total).

Los aislamientos clínicos multirresistentes fueron los que menos inhibición sufrieron en este ensayo. *P. aeruginosa*, una bacteria con resistencia intrínseca a diferentes antibióticos fue inhibida solo por el aislado S1H. *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) solo fueron inhibidas por seis y cuatro aislados nativos respectivamente, lo que podría explicarse por sus diferentes mecanismos de resistencia que les permiten evadir el mecanismo de acción de los diferentes compuestos producidos por las bacterias filamentosas.

La cepa de *E. coli* ATCC 700891 es resistente a ampicilina y estreptomina y sin embargo su crecimiento fue inhibido por 8 de los aislados nativos, esto podría indicar la producción por parte de estas bacterias filamentosas aisladas de compuestos con un mecanismo de acción diferentes a los de estos dos antibióticos. De igual forma, el aislado clínico de *S. aureus* resistente a meticilina fue inhibido por ocho aislados debido posiblemente a que estos producen compuestos antimicrobianos con un espectro más amplio que este antibiótico betalactámico.

**Tabla 2.** Aislados nativos de bacterias filamentosas que presentaron antagonismo contra alguno de los testigos evaluados.

Aislado nativo	Microorganismos testigo						
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i> ATCC29213	<i>E.coli</i> ATCC700891	MRSA	KPC	<i>E.coli</i> BLEE
S1B	-	-	±	+	+	-	-
S3B	-	+	+	+	+	-	+
S1C	-	+	-	-	-	-	-
S3E	-	±	+	-	+	-	-
S4E	-	+	+	±	+	-	±
S6E	-	+	-	-	-	-	-
S7E	-	+	-	-	-	-	-
S8E	-	±	-	+	-	-	+
S10E	-	+	±	-	-	-	-
S13E	-	-	-	+	-	+	+
S2F	-	+	+	-	+	-	-
S3F	-	+	+	+	+	-	-
S4F	-	+	+	+	+	-	-
S1H	+	+	+	+	+	+	+
S4H	-	+	-	-	-	-	-
S5H	-	+	±	-	±	-	-
S8H	-	+	-	-	-	-	-
S10H	-	+	-	+	-	+	+
S13H	-	-	-	±	-	+	+

+: actividad inhibitoria, -: no actividad inhibitoria, ± : actividad inhibitoria moderada

Cabe anotar que de los 19 aislados nativos, diez presentaron antagonismo solo contra bacterias Gram positivas, tres solo contra bacterias Gram negativas y seis contra Gram positivas y Gram negativas simultáneamente.

## CONCLUSIONES

Tanto en suelos nativos como en suelos intervenidos para el establecimiento de cultivos familiares se pueden encontrar bacterias filamentosas consistentes con el género *Streptomyces*. La cantidad de bacterias recuperadas a partir de las diferentes rizósferas fue diferente según la especie vegetal cultivada; es necesario profundizar el estudio sobre estas asociaciones pues la presencia de bacterias filamentosas en el suelo resulta benéfica además para la producción vegetal.

Los aislados nativos presentaron antagonismo contra microorganismos con y sin resistencia reportada a algún antibiótico. La variedad de mecanismos de resistencia evaluados y la inhibición de los testigos ocasionada por algunos aislados nativos indica la producción de compuestos antibacterianos con diferentes mecanismos de acción.

## REFERENCIAS

1. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 Jan;27(1):44–52.
2. de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics

- produced by *Streptomyces*. Brazilian J Infect Dis. 2012;16(5):466–71.
3. Asagbra AE, Sanni AI, Oyewole OB. Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. World J Microbiol Biotechnol. 2005 Mar;21(2):107–14.
  4. Arora A, Nain L, Gupta JK. Solid-state fermentation of wood residues by *Streptomyces griseus* B1, a soil isolate, and solubilization of lignins. World J Microbiol Biotechnol. 2005;21(3):303–8.
  5. Higgins CE, Kastner RE. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a b-Lactam antibiotic producer. Int J Syst Bacteriol. 1971;21(4):326–31.
  6. Ehrlich J, Gottlieb D, Burkholder PR, Anderson LE, Pridham TG. *Streptomyces venezuelae*, n. sp., the source of chloromycetin. J Bacteriol. 1948;56(4):467–77.
  7. Moellering RC. Vancomycin : A 50-Year Reassessment. Clin Infect Dis. 2017;42(October):3–4.
  8. Ballav S, Dastager SG, Kerkar S. Biotechnological significance of Actinobacterial research in India. Recent Res Sci Technol. 2012;4(4):31–9.
  9. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(6):426–35.
  10. Ceylan O, Okmen G, Ugur A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. EurAsian J Biosci. 2008;2:73–82.
  11. Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, Bora TC. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. J Mycol Médicale / J Med Mycol. 2007;17(4):242–9.
  12. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417–33.
  13. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nat Rev Microbiol. 2007;5(3):175–86.
  14. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014. 256 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247201%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  15. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 30]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>
  16. World Health Organization. Report of the 6th Meeting: WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance with AGISAR 5-year strategic framework to support implementation of the global action plan on antimicrobial resistance (2015-2019). Seoul: World Health Organization; 2015. 54 p.
  17. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación . Documento Conpes Social 155. Política Farmacéutica Nacional. Bogotá: Autor; 2012. p. 1–49.
  18. HIMEDIA. Streptomyces Agar - Technical data [Internet]. 2011. Available from: <http://himedialabs.com/TD/M1352.pdf>
  19. Mackay SJ. Improved enumeration of *Streptomyces* spp. on a starch casein salt medium. Appl Environ Microbiol. 1977;33(2):227–30.
  20. MacWilliams MP, Liao M-K. Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and their uses protocol [Internet]. Microbe Library. 2012. Available from: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3031-luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-their-uses-protocol>