# CARACTERIZACIÓN DEL O LOS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS DEL AISLADO BACTERIANO ANTÁRTICO M52-112-1 CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA SOBRE *SALMONELLA SP.*

## CHARACTERIZATION OF THE ANTIBACTERIAL COMPOUND (S) OF THE ANTARCTIC BACTERIAL ISOLATE M52-112-1 WITH ANTAGONISTIC CAPACITY ON *SALMONELLA SP.*

Francisca Ambiado • Constanza Espinoza
Profesor Guía: Iván Pincheira
Asesora Científica: Dra. Helia Bello
Colegio de los Sagrados Corazones de Concepción • Concepción
ipincheiraster@gmail.com

## Resumen

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas. Sin embargo, las bacterias se han vuelto resistentes, y como consecuencia de esto, muchos antibióticos en la actualidad no permiten a la medicina hacer tratamiento para enfermedades que están afectando a la humanidad. Aunque la resistencia a los antibióticos sea un fenómeno natural, el indebido uso que la sociedad está haciendo, está acelerando este proceso en todo el mundo, de manera alarmante. Apareciendo y propagándose nuevos mecanismos de resistencia bacteriana. Todo esto pone en evidencia la necesidad urgente de buscar nuevos compuestos con actividad antibacteriana. Este trabajo muestra organismos extremófilos presentes en el Territorio Antártico de Chile y que, el mundo científico internacional está muy interesado en dilucidar como fuente de sustancias antimicrobianas, presentes en ellos, los cuales podrían ser estudiados a nivel farmacológico con fines médicos. La idea puntual de este trabajo fue inhibir *Salmonella*. Se estudió el secretado por la bacteria antártica M52-112-1 que presenta(n) actividad antagónica sobre *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*. Entre las conclusiones que entregó el estudio del secretado está la que corresponde a un bacilo Gram negativo que presenta actividad antibacteriana sobre *Salmonella*. Su actividad antimicrobiana se encuentra al interior de la célula bacteriana, siendo la temperatura óptima 15°C para una mejor actividad.

**Palabras claves:** *Salmonella*; Organismo extremofilo; Resistencia bacteriana; Actividad antagónica; Antimicrobiano.

## Abstract

Antibiotics are medicines used to prevent and treat bacterial infections. However, the bacteria have become resistant, and as a consequence many antibiotics do not currently allow to treat diseases that are affecting humanity. Although resistance to antibiotics is a natural phenomenon, the undue use is accelerating resistance throughout the world. New mechanisms of bacterial resistance appear and spread evidencing the urgent need to look for new compounds with antibacterial activity. This work shows extremophile organisms present in the Antarctic Territory of Chile of international scientific interest because they can be new sources of antimicrobial substances. The specific purpose of this work was to inhibit *Salmonella*. The secretion produced by the Antarctic bacterium M52-112-1 that shows antagonistic activity on *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis* was studied. From the study it is concluded that the secreted corresponds to a Gram-negative bacillus that presents antibacterial activity on *Salmonella*. Its antimicrobial activity is found inside the bacterial cell, with an optimum temperature of 15°C for a better activity.

**Keywords:** *Salmonella*; Extremophilic organism; Bacterial resistance; Antagonistic activity, antimicrobial

# Introducción

Los antibióticos son los medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas; sin embargo, las bacterias se han vuelto resistentes, y como consecuencia de esto, los antibióticos ahora no hacen efecto en el tratamiento de determinada enfermedad. Cabe recalcar que son las bacterias, y no los humanos ni animales, los que se vuelven resistentes a los antibióticos, y estas bacterias pueden causar infecciones cuyo tratamiento se hace muy dificultoso. Además, estas bacterias fármaco-resistentes son más difíciles de tratar que las no resistentes y hoy día muchos fármacos dejan de ser usados en el tratamiento de enfermedades.

Aunque la resistencia a los antibióticos sea un fenómeno natural, el indebido uso que se les está dando en la actualidad, está acelerando este proceso en todo el mundo de manera alarmante. Provocando así que cada día aparezcan y se propaguen nuevos mecanismos de resistencia bacteriana y, por ende que, el tratamiento de las enfermedades infecciosas sea más difícil.

La pérdida de eficacia de los antibióticos, es una de las mayores amenazas para la salud mundial, la inseguridad alimentaria hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen la permanencia hospitalaria y aumente la mortalidad. Debido a que no se están implementando las medidas urgentes que este problema requiere, el mundo se ha expuesto y visto amenazado por una era post-antibióticos en la cual las infecciones comunes, que han sido tratadas con éxito años atrás, volverían a ser potencialmente letales. Dada la facilidad y la frecuencia con que actualmente se desplazan las personas son factores que pueden provocar pandemias en una dimensión a nivel mundial. La búsqueda de nuevos tratamientos es urgente.

Es así como, en Sudáfrica los pacientes con tuberculosis resistentes a todos los antibióticos conocidos ya son simplemente enviados a sus hogares para morir (OMS). Por otra parte, muchas grandes farmacéuticas han abandonado la búsqueda de nuevos medicamentos debido la escasa recompensa financiera y la falta de progreso en el descubrimiento de las mismas. Sin embargo, para algunos microbiólogos, estos son tiempos emocionantes en la investigación de antibióticos ya que hay una gran variedad de caminos por explorar, uno de ellos es la búsqueda de compuestos producidos por microorganismos, como es el caso del aislado Antártico M52-112-1.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana (1). En esta lista se hace hincapié a la amenaza que implican las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos, las cuales cuentan con la habilidad innata para encontrar nuevas formas de resistencia a los tratamientos, y pueden, además, transmitir el material genético permitiendo a otras bacterias hacerse fármaco-resistentes. Según la OMS, *Salmonella* es de prioridad elevada para la identificación y desarrollo de antibióticos que puedan inhibirla.

*Salmonella* es un género bacteriano que comprende bacilos Gram negativos que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Hasta la fecha se han identificado

más de 2500 serotipos o serovares diferentes distribuidos en dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. *Salmonella* es una bacteria omnipresente y resistente que puede sobrevivir durante varias semanas en un ambiente seco y varios meses en agua.

La mayoría de los serotipos se encuentran en una gran diversidad de hospedadores. Por lo general, esos serotipos causan gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. A ese grupo pertenecen *Salmonella enterica* serotipo *enteritidis* y *Salmonella enterica* serotipo *typhi*. Estos dos últimos constituyen los dos serotipos más importantes de *Salmonella* enterica transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo. (OMS)

Como se ha mencionado antes, el incremento de cepas resistentes a los antibióticos pone en evidencia la necesidad urgente de buscar nuevos compuestos con actividad antibacteriana. Por lo que nuestro equipo de investigación se ha interesado en los organismos extremófilos, los cuales, tal y como dice su nombre, viven soportando condiciones extremas, enfocándonos en los organismos antárticos. Las adaptaciones que estos han desarrollado los promueven como una nueva fuente potencial de recurso para crear compuestos antimicrobianos para controlar infecciones asociadas al hombre. Investigadores de INACH en la Península FILDES (Isla San Jorge), han realizado estudios para encontrar y caracterizar bacterias que posean actividad antagónica sobre patógenos de importancia para la salud humana, estos estudios se han centrado especialmente sobre bacterias multirresistentes a los antibióticos de uso clínico. Lo anterior apunta a la producción de compuestos de naturaleza proteica, del tipo de bacteriocinas u otros compuestos peptídicos.

Debido a todos los problemas que hemos descrito anteriormente, hemos querido aportar y continuar con la investigación para llegar a aislar el o los compuestos con actividad antimicrobiana, que inhiba a *Salmonella*. Lo anterior nos condujo a reformular la pregunta de investigación:

¿Cuál es la característica del o los compuestos antibacterianos secretados por la bacteria antártica M52-112-1 que presenta(n) actividad antagónica sobre *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*?.

## Objetivo General

"Identificar la naturaleza química del o los compuestos secretados por el aislado Antártico M52-112-1 con actividad antagónica sobre *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*."

## Objetivos Específicos

a. Determinar la naturaleza química del o los compuestos con actividad antibacteriana contra *Salmonella sp*.

b. Evaluar su actividad antagónica bajo distintos parámetros físicos o químicos.

c. Fomentar y difundir en la comunidad escolar la investigación científica escolar.

## Metodología

1. Corroboración de la actividad antimicrobiana del aislado bacteriano M52-112-1.

Con un asa se tomó muestras de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi* desde un cultivo bacteriano de 24 h en caldo TSA, luego se realizó una suspensión bacteriana hasta obtener una turbidez óptima de 0,5 Mc Farland, para cada muestra bacteriana utilizada. Esta suspensión bacteriana fue diseminada mediante una tórula sobre la superficie de placas de agar Müeller Hinton, de tal forma de obtener un cesped bacteriano.

Con la punta de una micropipeta se tomaron diferentes discos de 6mm de agar $R_2A$ cultivado anteriormente con el aislado bacteriano antártico M52-112-1 a diferentes temperaturas (15°C y 20°C), los cuales fueron depositados con pinzas sobre las placas anteriormente señaladas.



Figura Nº 1. Inicio del trabajo de actividad antimicrobiana.

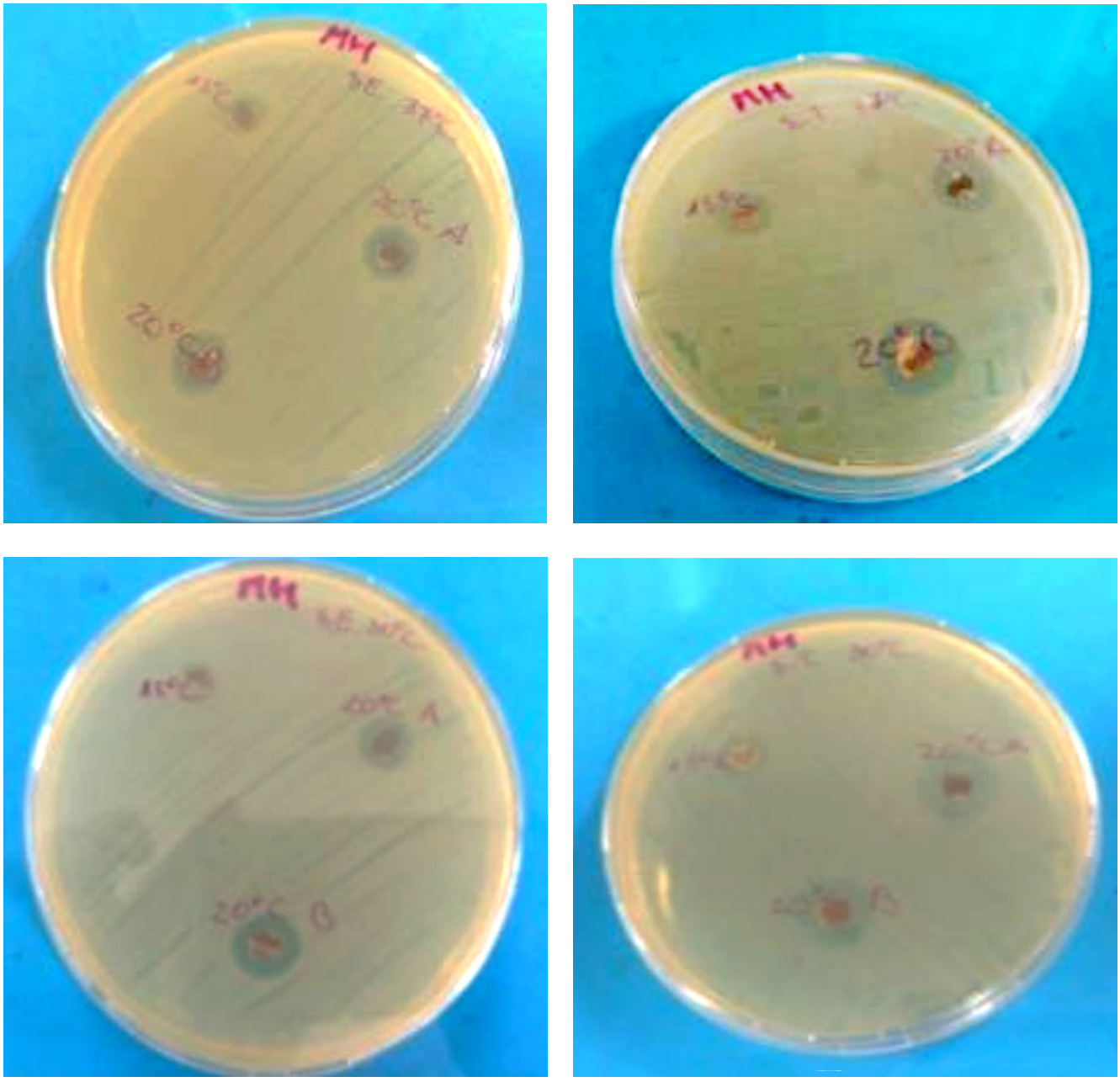


Figura Nº 2. Se hicieron duplicados cultivados a diferentes temperaturas (30°C y 37°C).

2. Determinación de la temperatura optima de crecimiento antimicrobiano.

- Se sembró en placas con agar Müeller Hinton, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi* en forma de césped.
- Usando la punta de la micropipeta hicieron pocillos, en los cuales se depositaron 80µl de la bacteria antártica cultivada en caldo $R_2A$ a diferentes temperaturas: 15°C, 20°C, 25°C y 30°C.
- Finalmente, las placas fueron incubadas en estufa de cultivo a una temperatura de 37°C.

3. Localización de la actividad antimicrobiana aislado bacteriano M52-112-1.

- Se traspasó un cultivo de bacteria de caldo $R_2A$ (3,5mL) a un tubo Falcon, este cultivo tenía 3 semanas.




Figura N° 3. Cápsulas de Petri con muestras en estudio.



Figura N° 4. Sonicador a una amplitud de 60%.

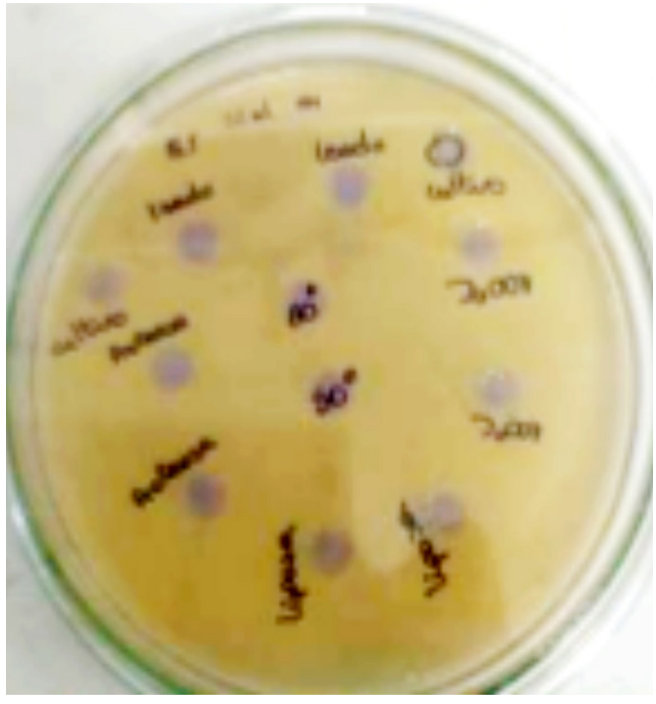


Figura N° 5. Cápsula de Petri con muestra en estudio.

- Luego este cultivo fue centrifugado a 12.000 rpm, obteniéndose la separación del pellet (bacterias) y el sobrenadante (productos solubles secretados por las bacterias).
- A continuación, se extrajo el sobrenadante con una micropipeta, y se depositó en tubos Eppendorf.
- El pellet se resuspendió con BFS (buffer fosfato salino), se lavó 3 veces y se agitó usando vortex.
- Las células bacterianas fueron lisadas mediante un sonicador a una amplitud de 60% para romper las estructuras celulares bacterianas.
- Este lisado se centrifugó, de manera de separar el pellet (insoluble) y el sobrenadante (intracelular o periplásmico soluble).

- Para depositar el sobrenadante, el lisado soluble, el lisado insoluble y el cultivo directo se hicieron pocillos con la punta de una micropipeta, donde se depositaron 100 µL de cada uno de las fracciones ensayados en duplicado, en placas previamente sembradas con *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*.

4. Evaluación de la termoestabilidad del compuesto.

La fracción soluble del lisado bacteriano se llevó a temperaturas de 100°C y 50°C por 10 min para comprobar su termoestabilidad.

- Se tomaron 500 µL de la fracción soluble y se redistribuyeron en tubos Epperdorf. A continuación, se sometieron a temperaturas de 50°C y100°C.
- Luego, se dispusieron 100 uL sobre pocillos realizados en placas de agar R2A impregnadas con *Salmonella tiphy* y *Salmonella enteritidis* (0,5 Mc Farland), sembrada en forma de césped. Se sembró además, la parte soluble del lisado sin tratar, y cultivo bacteriano a modo de control.

5. Evaluación de la naturaleza del compuesto.

- El pellet se incubó en presencia de proteasas y con la adición de una solución de SDS para evaluar la naturaleza del compuesto con actividad antagónica.
- 500 µL del sobrenadante obtenido posterior a la lisis, fue incubado en presencia de Proteinasa K (proteasa), y con una solución de SDS a 37°C por 3 horas.

6. Identificación del aislado M52-112-1.

El ADN bacteriano se obtuvo a partir de 1 mL de cultivo en medio líquido, incubado a 15ºC por 72 h, el cual fue lavado 2 veces en BFS y centrifugadas a 9000 rpm. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y, el pellet se resuspendió en 200 µL de Chélex 5 % con 2,5 µL de Proteinasa K, se agitó en vortex y se incubó a 56ºC por 45 min en baño termorregulado. Posteriormente, se volvió a agitar en vortex y se incubó por 8 min a 100 ºC, para finalmente, centrifugar por 2 a 3 min a 14.000 rpm y se almacenó a 4ºC. La concentración del ADN se determinó por absorbancia 260 nm y la pureza por la relación de absorbancias 260/280 nm, medidas en espectrofotómetro. Luego de cuantificar la concentración de ADN, se ajustó, aproximadamente, a 200-250 ng/µl, la que fue utilizada como plantilla de ADN para la llevar a cabo la reacción de polimerasa en cadena (RPC).
Tabla: Primers utilizados y tamaño del amplicón.
(Di Cello *et al*., 1997).

| Partidor | Secuencia del partidor (5´a 3) | Tamaño |
|---|---|---|
| P0 | 5´- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3´ | 1500 pb |
| P6 | 5´- CTACGGCTACCTTGTTACGA - 3´ | |

Los productos de amplificación fueron observados en un gel de agarosa al 1 %, el cual se corrió en una cámara de electroforesis, y posteriormente se reveló con Bromuro de Etidio. Los productos de PCR fueron enviados a la compañía MacroGen Corp., una vez recibidas las secuencias, los análisis bioinformáticos se realizaron por comparación de las secuencias obtenidas con aquellas informadas en la base de datos de la NCBI.

## Resultados

Corroboración de la actividad antimicrobiana del aislado bacteriano M52-112-1.

Siguiendo la metodología descrita y transcurrido 6 días aproximadamente se observan los halos de inhibición obtenidos con la bacteria antártica M52-112-1, cultivada en medio sólido obteniéndose los siguientes resultados:

| Tipo de *Salmonella* | Temperatura de incubación (ºc) | Temperatura de incubación del aislado M52-112-1 (ºc) | Halo de inhibición (mm) |
|---|---|---|---|
| *S. typhi* | 30 | 20 | 12 -14 |
| | | 15 | 9 |
| | 37 | 20 | 13 - 15 |
| | | 15 | 10 |
| *S. enteritidis* | 30 | 20 | 10 -11 |
| | | 15 | 6 |
| | 37 | 20 | 10 - 11 |
| | | 15 | 15 |

1. Temperaturas óptimas de crecimiento antimicrobiano

| Tipo de *Salmonella* | Temperatura de incubación del aislado M52-112-1 en medio liquido (°c) | Halo de inhibición (mm) |
|---|---|---|
| *S. typhi* | 15 | 15 |
| | 20 | 13 |
| | 25 | 0 |
| | 30 | Sin crecimiento |
| *S. Enteritidis* | 15 | 12 |
| | 20 | 9 |
| | 25 | 0 |
| | 30 | Sin crecimiento |

2. Localización del o los compuestos con actividad antibacteriana.

La actividad antimicrobiana se encuentra en el lisado, lo que corresponde al citoplasma bacteriano, en la parte soluble también se encuentra actividad microbiana pero es significativamente menor, por lo que los ensayos siguientes se centraron en la fracción soluble del cultivo bacteriano sometido a lisis.

3. Termoestabilidad del o los compuestos.

El compuesto parece ser termoestable mediante la metodología utilizada a 50°C y a 100°C. Al medir los halos se puede evidenciar un leve aumento en el halo de inhibición.

4. Naturaleza del Compuesto.

Mediante la metodología utilizada el compuesto no parece tener naturaleza lipídica o proteica, los halos de inhibición se mantienen comparando el lisado sin tratamiento y el lisado tratado con proteasas o con lipasas.

5. Identificación bacteriana del aislado M52.112-1.

El análisis del ADNr16s indicó 99% de similitud con *Janthinobacteirum sp*. (número de acceso: pJX624164.1) y *Duganella sp*. (número de acceso: HM149214.1).

A partir de la revisión bibliográfica, el equipo investigador escolar, encontró motivación adicional para continuar con la investigación. En ellos se señalan que enfermedades como la salmonelosis, impactan fuertemente en el costo de tratamientos en nuestros países. Por lo que creemos que es importante continuar con este tipo de experiencias usando aislados bacterianos antárticos. En estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Investigación en agentes Antibacterianos, sobre la bacteria se determinó que la actividad antibacteriana se encontraba en el sobrenadante del cultivo bacteriano, y que este era susceptible frente a proteasas e inestable a la temperatura, por lo que podríamos inferir que se tratarían de compuestos distintos. De esta forma se hacen necesarios nuevos estudios para poder determinar los distintos compuestos antibacterianos que sintetiza esta bacteria y relacionar esto con su fase de crecimiento. Es de vital importancia recalcar el impacto de esta investigación, ya que el uso de antibióticos clásicos ejerce una presión selectiva, que favorece la selección de bacterias multiresistentes, esta problemática se ha visto incrementada en bacterias intrahospitalarias, y mediante estos descubrimientos podemos estar frente a nuevas alternativas de tratamiento. Es de importancia considerar las adaptaciones que los microorganismos han desarrollado, los promueven como una nueva fuente potencial de recurso para crear compuestos antimicrobianos para controlar infecciones asociadas a la salud.

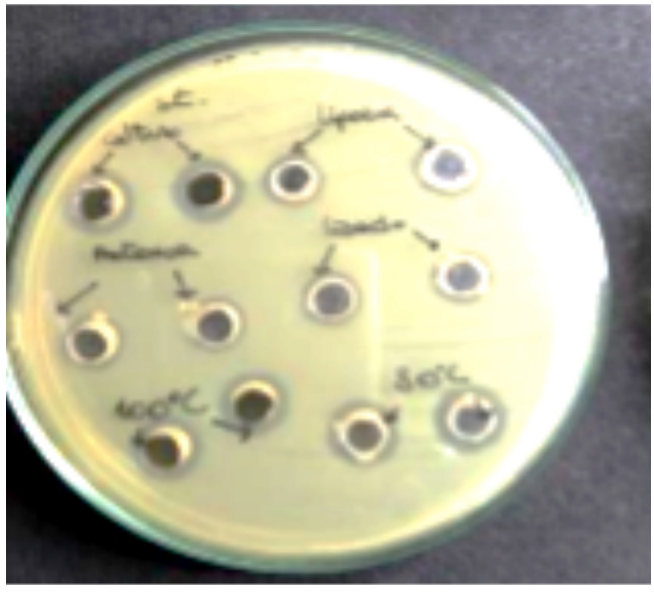


Figura N° 6. Cápsula de Petri donde se estudia la naturaleza del compuesto.

## Conclusiones

A partir de la investigación se puede concluir que:

1. El aislado antártico M52.112-1 corresponde a un bacilo Gram negativo que presenta actividad antibacteriana sobre *Salmonella*, determinado por el halo de inhibición observado.
2. La temperatura óptima para una mejor actividad antibacteriana sobre *Salmonella spp*. es de 15°C.
3. Los compuestos con actividad antimicrobiana sobre *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi* producidos el aislado antártico M52.112-1 se encuentra al interior de la célula bacteriana.
4. El aislado antártico M52.112-1 puede corresponder a una cepa de *Janthinobacteirum sp*. (número de acceso: pJX624164.1) ó *Duganella sp*. (número de acceso: HM149214.1).

## Bibliografía

Organización Mundial de la Salud. Centro de Prensa. 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. http://www.aaiba.org.ar/newsletter/2017/02.pdf

Organización Mundial de la Salud. 2014. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/

Instituto de Salud Pública. 2018. Vigilancia de *Salmonella spp*. Instituto de Salud Pública de Chile.. http://www.ispch.cl/documento/15068

Is Global. 2017. Instituto de Salud Global. Barcelona. https://www.isglobal.org/es/informe-la-batalla-contra-las-resistencias

Organización Mundial de la Salud. 2017. *Salmonella* (no tifoidea). www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es

Asencio G, Lavin P, Alegría K, Domínguez M, Bello H, González-Rocha G, González-Aravena M. 2014. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium sp*: SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. Electronic Journal of Biotechnology 17: 1-5.

San-Martin A, Vaca I. 2010. Nuevos compuestos con actividad farmacológica: la riqueza oculta en los hongos filamentoso antárticos. Boletín Antártico Chileno 29: 13-14.