



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

Micromundo@Jaén: Ciencia ciudadana para la búsqueda de nuevos antimicrobianos

Autor: Isaac García Alcántara

Grado en Biología

Fecha: 03/06/2024



CREA



Universidad de Jaén



Facultad de
Ciencias Experimentales

UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Micromundo@Jaén: Ciencia ciudadana para la búsqueda de nuevos antimicrobianos

Alumno: Isaac García Alcántara

Isaac García

Junio, 2024

ÍNDICE:

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Iniciativa MicroMundo.....	2
1.2 Antibióticos y su resistencia.....	3
1.3.1 Bacterias ESKAPE y su importancia clínica	4
1.3.1 Enterococcus faecium (E)	5
1.3.2 Staphylococcus aureus (S)	6
1.3.3 Klebsiella pneumoniae (K)	6
1.3.4 Acinetobacter baumannii (A)	7
1.3.5 Pseudomonas aeruginosa (P).....	8
1.3.6 Enterobacter spp. (E).....	8
1.4 Principales bacterias resistentes a antibióticos.....	9
1.5 Principales bacterias productoras de antibióticos	11
1.6 Actualidad del uso de antibióticos	13
1.7 Reportes GLASS.....	14
2. OBJETIVOS:	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Material	16
3.2 Aislamiento de las bacterias de suelo.....	17
3.3 Detección de halos por antibióticos	18
3.4 Aislamiento de bacterias productoras de antibióticos	19
3.5 Tinción de Gram y visualización de morfología	19
3.6 Ensayo para comprobar la posible actividad antimicrobiana. Ensayo por gota sobre césped.....	20
3.7 Ensayo de tripsina.....	20
4. RESULTADOS	21
4.1 Resultados de la tinción de Gram:	21
4.2 Resultados de la prueba de la gota:.....	25
4.3 Resultados de la prueba de la tripsina	30
5. DISCUSIÓN:.....	32
6. CONCLUSIONES	34
7. BIBLIOGRAFÍA	35

RESUMEN

En el presente trabajo se resume el proceso de obtención y evaluación de bacterias potencialmente capaces de la producción de nuevos antibióticos, realizado mediante la estrategia de "Crowdsourcing". En este proyecto, estudiantes universitarios de la Universidad de Jaén, denominados SWITAs, asesoran a grupos de alumnos de instituto en la recolección y categorización de bacterias presentes en muestras de suelo recolectadas por los mismos estudiantes. Para ello, se emplean técnicas microbiológicas con el objetivo de identificar estas bacterias morfológicamente y clasificarlas mediante la tinción de Gram, así como evaluar su posible capacidad antimicrobiana mediante pruebas de susceptibilidad frente a cepas bacterianas incluidas en las denominadas "ESKAPE". Además, se caracteriza la naturaleza (proteica o no) de los compuestos antimicrobianos mediante el método de la proteasa.

ABSTRACT

The present work summarizes the process of obtaining and evaluating potential bacteria that may have the capability to produce new antibiotics, carried out through a "Crowdsourcing" strategy. In this project, university students from the University of Jaén, called SWITAs, advise groups of high school students in the collection and categorization of bacteria present in soil samples collected by the students themselves. To do this, microbiological techniques are used to identify bacteria morphologically and classify them using Gram staining, followed by evaluating their possible antimicrobial capacity through susceptibility tests against bacterial strains included in the so-called "ESKAPE" group. Furthermore, the nature (proteinaceous or not) of the antimicrobial compounds is characterized using the protease method.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Iniciativa MicroMundo

En este proyecto se hablará sobre los resultados obtenidos de un estudio que empleó la metodología de "crowdsourcing" para la recolección de muestras de suelo en la provincia de Jaén, en colaboración con alumnos de centros de educación secundaria, en este caso el centro educativo "Colegio concertado Pedro Poveda (Las Teresianas)". También se participó en el instituto IES Az-Zait, aunque en este trabajo no se trabajará con los datos obtenidos en el mismo. Este trabajo forma parte de un proyecto a escala global denominado "Small World Initiative" (SWI), y posteriormente "Tiny Earth", diseñado para abordar la urgente necesidad de descubrir nuevos antibióticos, tal como lo indica la Organización Mundial de la Salud (OMS) acerca de la creciente resistencia microbiana a estos medicamentos, una de las mayores amenazas médicas del siglo XXI.

La génesis de esta iniciativa se remonta a 2012 en la Universidad de Yale (EEUU), bajo el liderazgo de la Dra. Jo Handelsman, y actualmente se extiende a más de 10 países, habiendo debutado en España durante el curso académico 2016-2017, involucrando a 20 universidades nacionales, entre ellas la Universidad de Jaén, bajo la versión española conocida como MicroMundo (logo en la Figura 1.1).



Figura 1.1.- Logo de la iniciativa MicroMundo (Sociedad Española de Microbiología).

MicroMundo, como derivación de la "Initiative Small World/tiny earth", se enfoca en la capacitación de estudiantes universitarios a través del modelo de aprendizaje servicio (ApS), el cual ha demostrado una eficacia notable en la facilitación de talleres destinados a la identificación de microorganismos con

potencial actividad antimicrobiana presentes en suelos locales, llevados a cabo en instituciones de educación secundaria. De esta forma, se contribuye activamente al proyecto de alcance nacional previamente mencionado (Lucas *et al.* 2018).

MicroMundo es un proyecto es un proyecto jerarquizado en el cual cada participante o integrante tiene un papel o rol determinado, distinguiéndose tres niveles:

- **SWIPI:** Profesor e investigador universitario que lidera un equipo de trabajo.
- **SWITA:** Estudiante universitario que forma parte de un grupo de entre 3 y 6 miembros. Estos estudiantes son responsables de dirigir las sesiones, comunicarse y explicar los procedimientos a los alumnos del centro escolar. Antes de asistir a los centros escolares, deben preparar el material necesario.
- **Investigadores SWI:** Alumnos del centro escolar donde se llevan a cabo las sesiones.

Los objetivos fundamentales de esta asociación son múltiples: fomentar el interés de los estudiantes de Educación Secundaria Obligatoria (ESO) y Bachillerato en las Ciencias Experimentales y la Investigación en Biomedicina, difundir la cultura científica y sensibilizar a la sociedad sobre la problemática asociada al abuso de antibióticos y la creciente resistencia bacteriana, y colaborar en la exploración de microorganismos del suelo productores de sustancias antimicrobianas, con el propósito de catalizar el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas antibióticas (Sociedad Española de Microbiología, 2024).

1.2 Antibióticos y su resistencia

Los antibióticos son sustancias producidas por una gran variedad de microorganismos, como bacterias (principalmente actinomicetos) y hongos que poseen la capacidad de suprimir el crecimiento de otros microorganismos y, en ocasiones, destruirlos (Camacho Assef, 2005). Con respecto a los antibióticos producidos por bacterias, existen diferentes orígenes de las resistencias bacterianas, pudiéndose clasificar en las siguientes :

-Resistencia natural: ocurre cuando todas las cepas de una especie bacteriana son naturalmente resistentes a un antibiótico. Esto puede deberse a características estructurales de la bacteria, como la impermeabilidad de la pared celular a ciertos antibióticos.

-Resistencia adquirida: se refiere a la resistencia que se desarrolla en cepas bacterianas que anteriormente eran sensibles a un antibiótico. Puede surgir por mutaciones genéticas o por la adquisición de nuevos genes de resistencia.

-Resistencia por mutación: afecta a un pequeño porcentaje de cepas bacterianas y resulta de mutaciones espontáneas en su material genético. Las bacterias mutantes seleccionadas por la presencia de antibióticos pueden volverse resistentes.

-Resistencia horizontal: se refiere a la transferencia de genes de resistencia entre bacterias de diferentes especies, a menudo a través de mecanismos como la transducción, la transformación y la conjugación. Esto puede llevar a la rápida propagación de la resistencia entre diferentes tipos de bacterias.

-Resistencia múltiple o multirresistencia: ocurre cuando una bacteria desarrolla resistencia a múltiples clases de antibióticos, lo que dificulta su tratamiento. Esto puede ser el resultado de la presencia de plásmidos con varios genes de resistencia o de mutaciones que afectan a diferentes antibióticos.

-Resistencia por modificación del blanco del antibiótico: las bacterias pueden modificar la estructura de la molécula objetivo del antibiótico, lo que hace que el antibiótico sea menos efectivo para inhibir su actividad.

-Resistencia por inactivación del antibiótico: las bacterias pueden producir enzimas que desactivan o modifican el antibiótico, haciéndolo ineficaz (Oromí, Durich, 2000).

1.3.1 Bacterias ESKAPE y su importancia clínica

El acrónimo ESKAPE hace referencia a los seis microorganismos que conforman este grupo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp* (Mulani. et al, 2019). Estas seis bacterias se caracterizan por su capacidad para

“escapar” a la acción biocida de los antibióticos y por representar colectivamente nuevos paradigmas en la patogénesis, transmisión y resistencia a antibióticos y terapias antibacterianas (Pendleton *et al*, 2013). A continuación, se explican sus principales características biológicas y de resistencia:

1.3.1 *Enterococcus faecium* (E)

Enterococcus faecium es una bacteria, Gram positiva, con morfología de cocos cortos en pares o cadenas cortas, anaerobia facultativa y oportunista, comúnmente asociada con Infecciones Relacionadas con la Atención en Salud (IRAS) (Pendleton *et al.*, 2013). Esta bacteria tiene una alta capacidad de colonización del intestino y la piel, así como una notable persistencia en el medio ambiente. Tradicionalmente, las infecciones por enterococos se trataban con una combinación de antibióticos que afectan la pared celular, como la amoxicilina, y un aminoglucósido como la estreptomicina (Bush, *et al*, 2019).

Sin embargo, en la actualidad, este microorganismo ha desarrollado una resistencia casi total a los antibióticos β -lactámicos, siendo completamente resistente en algunos casos, como con la Ampicilina y el Imipenem. Además, se ha observado un aumento en la resistencia a la vancomicina, con un incremento del 20% al 30% entre 2001-2002 y 2005-2006, según estudios del Programa de Vigilancia de Resistencia a la Bacteremia (BSAC).

Los enterococos resistentes a la vancomicina también contienen islas de patogenicidad en su ADN genómico, que codifican factores de virulencia, incluyendo proteínas de superficie que promueven la formación de biofilms más gruesos. Esto, junto con su capacidad para colonizar tanto superficies inanimadas como la piel, los hace especialmente aptos para causar infecciones en dispositivos médicos permanentes.

Además de la resistencia a los β -lactámicos, *Enterococcus faecium* ha desarrollado otro mecanismo de resistencia mediante un complejo clúster de genes, que altera la diana de la pared bacteriana, confiriendo resistencia a los glicopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina, utilizados comúnmente en la práctica clínica (Bush & Perez, 2019).

1.3.2 *Staphylococcus aureus* (S)

Staphylococcus aureus es una bacteria, Gram positiva, con morfología en forma de coco, puede aparecer en parejas o en racimos, anaerobia facultativa, que se encuentra comúnmente en la microbiota de la piel y en áreas húmedas del cuerpo como las axilas o el interior de la nariz. Esta bacteria es un patógeno destacado en heridas, capaz de causar infecciones agudas y crónicas mediante la formación de biofilms. Los aislados de *Staphylococcus* poseen numerosas proteínas extracelulares, como hemolisinas y proteasas, que les permiten establecerse en el huésped al romper tejidos para nutrirse. Además, emplean estrategias de virulencia como el uso de pigmentos carotenoides para evadir el sistema inmune.

La multitud de factores de virulencia, junto con la capacidad de adquirir resistencia a antibióticos, hacen de *Staphylococcus* un patógeno humano exitoso, lo que lo convierte en una prioridad de salud pública. Las cepas resistentes a Meticilina (SARM) han desarrollado resistencia a los antibióticos β -lactámicos mediante la expresión de *mecA*, que codifica una proteína de unión a la penicilina. Estas cepas representan una proporción significativa de los aislados de *Staphylococcus* en muchos países, y aunque solían tratarse con antibióticos glicopeptídicos, como la vancomicina, la emergencia de SARM resistentes ha planteado desafíos adicionales en la terapia antimicrobiana (Neely & Maley, 2000).

1.3.3 *Klebsiella pneumoniae* (K)

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram negativa, con morfología bacilar agrupadas en parejas o cadenas, anaerobia facultativa, perteneciente a la familia de las enterobacterias. Esta bacteria, junto con *Escherichia coli*, representa una importante amenaza patológica, siendo prevalente tanto en entornos hospitalarios como comunitarios. Esta bacteria se encuentra en las mucosas superficiales de mamíferos y en el medio ambiente. Mayormente responsable de infecciones en niños, adultos mayores e inmunodeprimidos, *K. pneumoniae* tiende a colonizar el tracto gastrointestinal y, con menor frecuencia, el tracto nasofaríngeo. Intrínsecamente virulenta, puede causar infecciones invasivas debido a sus adhesinas de fimbria y a una cápsula gruesa que actúa como un

factor antifagocítico. Además, algunas cepas pueden formar biofilms, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones que causan.

Este microorganismo destaca por su capacidad para acumular y diseminar rápidamente determinantes de resistencia a múltiples fármacos, incluyendo enzimas β -lactámicas que hidrolizan el anillo β -lactámico. Las cepas resistentes de *K. pneumoniae* están en aumento, y las enterobacterias resistentes a carbapenemas están cada vez más implicadas en brotes de infecciones a nivel mundial. Aunque la implementación de prácticas agresivas de control de infecciones ha demostrado reducir la propagación de cepas resistentes, aún hay una escasez de antibióticos en desarrollo avanzado contra estos patógenos resistentes (Vera et al, 2017).

1.3.4 *Acinetobacter baumannii* (A)

Acinetobacter baumannii es un patógeno oportunista Gram negativo, con morfología cocal o bacilococal, asociado comúnmente con infecciones de la piel, sangre, tracto urinario y otros tejidos blandos. Destaca por su capacidad de persistencia ambiental, pudiendo sobrevivir hasta cinco meses en superficies inanimadas, y por su adaptabilidad a una amplia gama de condiciones ambientales. Es frecuente encontrar estas bacterias en unidades de cuidados intensivos y salas quirúrgicas, donde el uso extensivo de antibióticos ha seleccionado resistencia contra todos los antimicrobianos conocidos.

La resistencia intrínseca de *A. baumannii* a antibióticos se debe a características como una membrana externa típica de Gram negativas, sistemas activos de bomba de flujo y expresión reducida de porinas de membrana externa. Las cepas multirresistentes poseen islas de resistencia que codifican resistencia a antibióticos y metales pesados, así como bombas de flujo de resistencia a drogas. Esto ha llevado al surgimiento de aislados con betalactamasas de espectro extendido, que presentan resistencia a todos los antimicrobianos conocidos, incluyendo el Imipenem y la colistina.

La combinación de virulencia intrínseca y múltiples factores de resistencia a antibióticos hacen de *A. baumannii* un patógeno paradigmático en términos de patogenicidad. Sin embargo, la falta de compuestos candidatos en desarrollo avanzado para tratar infecciones de *Acinetobacter* con resistencia a múltiples

fármacos subraya la incongruencia entre el suministro farmacéutico y la demanda clínica actual de nuevos antimicrobianos (Reina *et al*, 2022).

1.3.5 *Pseudomonas aeruginosa* (P)

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, con morfología bacilar y presencia de flagelos polares, que actúa como un patógeno oportunista, comúnmente asociado con pacientes de cáncer, fibrosis quística o quemaduras. Las *Pseudomonas aeruginosa* tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones micro aeróbicas y una versatilidad nutricional que le permite prosperar en diversos ambientes, incluso en soluciones antimicrobianas y utilizando una amplia gama de moléculas orgánicas como fuente de nutrientes, incluso diésel. Esta ubicuidad le permite persistir en entornos hospitalarios, siendo una de las principales causas de infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas (Lopardo *et al*, 2014).

Los mecanismos de adherencia de *P. aeruginosa* al huésped se ven reforzados por el uso de flagelos y Pili, y una vez unidos, emplean péptidos quelantes como sideróforos para superar la privación de hierro causada por las respuestas inmunitarias del huésped. Su capacidad de persistencia conlleva la aparición frecuente de mutaciones puntuales que confieren resistencias, como la pérdida de porinas de la membrana asociada con la resistencia al Imipenem y una susceptibilidad reducida al meropenem. Además, *P. aeruginosa* presenta mecanismos de betalactamasa de espectro extendido, lo que complica la selección de terapias antimicrobianas adecuadas (Khedher, 2011).

1.3.6 *Enterobacter spp.* (E)

Enterobacter spp. es un grupo de bacterias Gram negativas, morfología diversa que varía desde cocobacilos hasta bacilos rectos con presencia de flagelos filamentosos, anaerobias facultativas, que se encuentran en el ambiente y en el tracto intestinal humano, con algunas especies como *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* que son patógenas y causan infecciones oportunistas, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. Estas bacterias tienen predilección por infectar el tracto urinario, respiratorio y pueden provocar infecciones del torrente sanguíneo. En los últimos años, han surgido como responsables de infecciones nosocomiales graves, mostrando una amplia

resistencia a múltiples fármacos mediante la expresión de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas codificadas por plásmidos. Excepto en casos de tratamiento con Colistina y Tigeciclina, pocos antibióticos son efectivos contra estos organismos, y la escasez de medicamentos conocidas para abordar la crisis global de la resistencia a los antibióticos plantea un desafío significativo en la práctica clínica actual (Lopardo *et al*, 2014).

1.4 Principales bacterias resistentes a antibióticos

Las bacterias, un grupo diverso de organismos unicelulares, ocupan un lugar central debido a su abundancia, diversidad genética y relevancia en múltiples aspectos de la vida cotidiana. La microbiología no solo se enfoca en la caracterización de bacterias en términos de su morfología, estructura celular, metabolismo y genética, sino que también abarca aspectos más amplios como la ecología microbiana, que explora las interacciones entre microorganismos y su entorno físico y biológico (OMS, 2020).

En el ámbito médico, la resistencia a los antibióticos representa uno de los mayores desafíos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Las bacterias resistentes a los antibióticos, como las del grupo ESKAPE, son especialmente preocupantes debido a su capacidad para evadir los efectos de múltiples clases de antibióticos. Estas bacterias han desarrollado una gran variedad de mecanismos de resistencia, que incluyen la producción de enzimas que degradan los antibióticos, la modificación de los sitios de unión de los fármacos y la expulsión activa de los antibióticos de las células bacterianas, algunos de estos mecanismos pueden verse en la Figura 1.2. Como resultado, las infecciones causadas por estas bacterias son más difíciles de tratar y pueden ser potencialmente mortales, especialmente en entornos clínicos como hospitales y centros de atención médica (OMS, 2020).

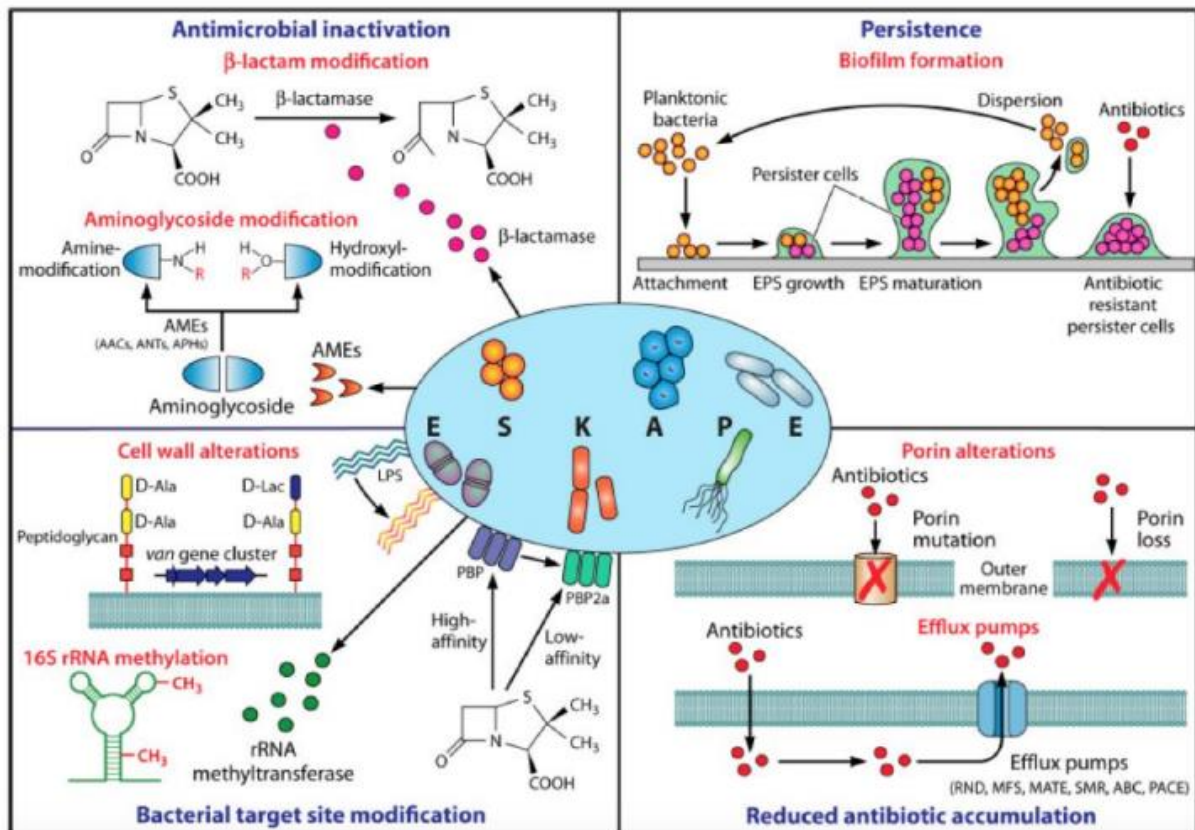


Figura 1.2.- Mediadores de la resistencia antimicrobiana de patógenos ESKAPE. Se observan los mecanismos de inactivación o alteración del antibiótico, comprendido por la modificación beta-lactámica y de aminoglucósidos; la modificación del sitio de unión del antibiótico, compuesto por alteraciones de la pared celular y la metilación en el rRNA 16S; la reducción de la acumulación intracelular del antibiótico, comprendido por la alteración de porinas y las bombas de flujo y, finalmente, la persistencia, que comprende la formación de biofilms (Oliveira *et al*, 2020).

Otro fenómeno preocupante es la proliferación de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), un tipo de enzimas que confieren resistencia a una amplia gama de antibióticos β -lactámicos, incluidas las penicilinas y las cefalosporinas. La presencia de BLEE en bacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* ha complicado aún más el tratamiento de infecciones bacterianas comunes, como las del tracto urinario y las respiratorias (Oliver & Cantón, 2016).

Para comprender mejor la diversidad y la distribución de las bacterias, así como su respuesta a los antibióticos, se pueden utilizar una gran variedad de técnicas de laboratorio, incluida la observación microscópica y la tinción de Gram. Esta última técnica, desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en

1884, permite distinguir entre dos grandes grupos de bacterias: las Gram-positivas, que retienen el colorante violeta-azul y aparecen de color púrpura oscuro o azul al microscopio, y las Gram-negativas, que no retienen el colorante y aparecen de color rojo o rosa al microscopio. Estas diferencias en la estructura celular tienen importantes implicaciones en la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos y en su capacidad para causar enfermedades (Oliver & Cantón, 2016).

1.5 Principales bacterias productoras de antibióticos

El suelo, aunque imperceptible a simple vista, alberga una diversidad microbiana excepcionalmente rica. Un solo gramo de suelo, materia prima empleada en estudios como los usados por la iniciativa MicroMundo, contiene una plétora de especies microbianas, ascendiendo a decenas de miles, así como miles de millones de células individuales. Este ecosistema terrestre se caracteriza por su alta densidad poblacional y su naturaleza heterogénea, siendo extremadamente dinámico. Esta característica impulsa el interés en los microorganismos que lo habitan, quienes, en respuesta a la abundante diversidad y las condiciones cambiantes, se ven obligados a interactuar, adaptarse y, en ocasiones, competir por recursos escasos. En este contexto, la producción de compuestos químicos, como los antibióticos, emerge como una estrategia fundamental para asegurar la supervivencia frente a competidores y fluctuaciones ambientales (Acebo, 1970).

Entre los productores de antibióticos residentes en el suelo se destacan hongos, como *Penicillium*, *Cephalosporium* y *Aspergillus*, así como bacterias como *Pseudomonas* y *Bacillus*. Sin embargo, los actinomicetos, un filo bacteriano que recuerda fenotípicamente a los hongos (Kalakoutskii, *et al.* 1976), ocupan un lugar preeminente. Estos organismos, especialmente el género *Streptomyces*, son responsables de la síntesis de hasta dos tercios de los antibióticos empleados en la práctica clínica actual. La riqueza de estos microorganismos en el suelo se atribuye a la presencia de lo que se conoce como "clústeres de genes biosintéticos" (BGC), fragmentos de ADN que codifican para la producción de moléculas bioactivas, incluyendo antibióticos. La activación de estos genes está influenciada por el entorno y las interacciones microbianas, lo que sugiere un vasto potencial aún por descubrir y explotar (Acebo, 1970).

El reconocimiento del suelo como una fuente de antibióticos fue impulsado por pioneros en microbiología como Selman Waksman. Su trabajo en el estudio de los microorganismos del suelo, centrado en su influencia en la agricultura, reveló la importancia de estos microorganismos en procesos fundamentales como la descomposición de materia orgánica y el ciclo de nutrientes. Waksman, especialmente interesado en las interacciones microbianas en el suelo, desarrolló técnicas innovadoras para investigar estas relaciones, lo que eventualmente condujo al descubrimiento de la Tirotricina por su estudiante René Dubos en 1939.

Durante la Segunda Guerra Mundial, Waksman desarrolló la "plataforma Waksman", un conjunto de técnicas para evaluar la sensibilidad bacteriana a compuestos producidos por otros microorganismos. Este enfoque, precursor del análisis contemporáneo de antibiosis, condujo al descubrimiento de varios antibióticos, incluyendo la estreptomicina, que le valió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1952 por su eficacia contra *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque la investigación inicial se centró en bacterias, Waksman también exploró el potencial antibiótico de los hongos presentes en el suelo, identificando compuestos como la fumigacina y la clavacina. La metodología desarrollada por Waksman inspiró a la industria farmacéutica a adoptar métodos de cribado de suelo para la búsqueda de nuevos antibióticos, marcando una era de descubrimientos que culminó en la identificación de más de veinte clases de antibióticos entre las décadas de 1940 y 1970.

Aunque la búsqueda de nuevos antibióticos se ha enfrentado a obstáculos, como la inversión requerida, la duración de los procesos y la baja probabilidad de éxito bajo condiciones de laboratorio convencionales, sigue siendo un objetivo relevante. Ante la creciente amenaza de resistencia antibiótica, la exploración de nuevas fuentes de antibióticos, incluidos los microorganismos del suelo, se presenta como una estrategia crucial. A pesar de que solo se estima que el 1 % de las bacterias del suelo son cultivables en laboratorio, los avances en métodos de cultivo prometen desvelar nuevos secretos que yacen en este vasto ecosistema terrestre. En este sentido, la continuación de la tradición de investigación iniciada por Waksman en MicroMundo y otros proyectos representa un compromiso con la exploración y explotación del potencial antimicrobiano del

suelo, abriendo nuevas posibilidades en la lucha contra las enfermedades infecciosas y la resistencia bacteriana (Micromundo, 2023).

1.6 Actualidad del uso de antibióticos

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia como resultado del uso indiscriminado de antibióticos o su uso innecesario en patologías. Entre estos mecanismos se incluye la expulsión activa del antimicrobiano mediante bombas expulsoras, la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana mediante la pérdida o modificación de canales de entrada, la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos, y la modificación de proteínas esenciales para la supervivencia bacteriana, lo que impide la acción de los antibióticos (Pérez, 1998).

La consulta externa y la atención en la comunidad representan escenarios cruciales para la promoción del uso racional y/o juicioso de los antibióticos, dado que las infecciones del tracto respiratorio constituyen una de las principales causas de consulta tanto en pediatría como en medicina de adultos, seguidas por las infecciones gastrointestinales y de la piel, entre otras afecciones (Choez, 1970).

Numerosos estudios han evidenciado que una proporción considerable de prescripciones de antibióticos se realiza de manera empírica, superando el 50% en varios casos. Es importante destacar que entre una tercera parte y la mitad de estas prescripciones corresponden a infecciones del tracto respiratorio, a pesar de que la mayoría de estas infecciones tienen origen viral. Se ha demostrado que los antibióticos no influyen en la duración, síntomas e intensidad de la enfermedad en este tipo de infecciones. Diversos factores intervienen en esta práctica, tanto por parte de los médicos como de los pacientes. Por ejemplo, algunos profesionales de la salud mantienen la errónea creencia de que prescribir antibióticos protege al paciente ante la eventualidad de una infección bacteriana subsiguiente, una noción que carece de evidencia sólida, pero que se encuentra arraigada en la práctica clínica (Chem, *et al*, 2018).

Por otra parte, la prescripción de antibióticos proporciona una sensación de tranquilidad a algunas personas, quienes confunden la utilidad de estos fármacos con la búsqueda de alivio sintomático. En ocasiones, algunos pacientes incluso demandan este tipo de tratamiento. La automedicación, las enfermedades

febriles, las infecciones que se presentan en la consulta externa y la interrupción del tratamiento con antibióticos ante la disminución o mejoría de los síntomas son escenarios comunes en el uso ambulatorio de antibióticos (Oviedo Córdoba *et al*, 2017).

1.7 Reportes GLASS

La iniciativa del Sistema de Vigilancia y Uso de Resistencia Antimicrobiana a nivel Global (GLASS, por sus siglas en inglés) es un esfuerzo colaborativo liderado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para abordar la creciente amenaza de resistencia a los antimicrobianos. El Informe GLASS 2022 proporciona una evaluación detallada de la resistencia antimicrobiana y el uso de antimicrobianos a nivel mundial. A través de GLASS, se recopila y analiza datos de resistencia antimicrobiana de diversos países, lo que permite detectar tendencias y patrones emergentes. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos para mejorar la vigilancia, el informe señala un aumento en la resistencia a los antibióticos en algunas áreas. Este aumento puede atribuirse a diversos factores, como el uso inapropiado de antibióticos en humanos y animales, la falta de acceso a medicamentos de calidad, la propagación global de patógenos resistentes y la insuficiente investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. Además, el impacto de la pandemia de COVID-19 ha exacerbado esta situación al aumentar la presión sobre los sistemas de salud y fomentar un uso excesivo e inadecuado de antibióticos.

Los datos obtenidos de este informe son los siguientes:

- El análisis de series temporales de 2017 a 2020 en el Informe GLASS 2022 revela medias de porcentajes de resistencia estables a lo largo del tiempo para muchas combinaciones de patógenos bacterianos y antimicrobianos.
- Solo 4 de 17 combinaciones mostraron un cambio de más del 15% en la resistencia media en 2020 en comparación con 2017, lo que sugiere estimaciones de resistencia generalmente estables.
- Algunos cambios notables incluyen aumentos en la resistencia a meropenem y cefalosporinas de tercera generación en infecciones sanguíneas por *Escherichia*, resistencia a ciprofloxacino en infecciones

sanguíneas por *Salmonella* spp. y resistencia a azitromicina en infecciones por gonorrea.

Los porcentajes de resistencia media mostrados en el informe son específicos del grupo de países considerados en cada serie temporal y pueden no representar tendencias globales, lo que destaca la necesidad de interpretación cautelosa y esfuerzos dirigidos de aseguramiento de calidad.

A continuación en la Figura 1.3 se reflejan los datos de los reportes GLASS de forma gráfica:

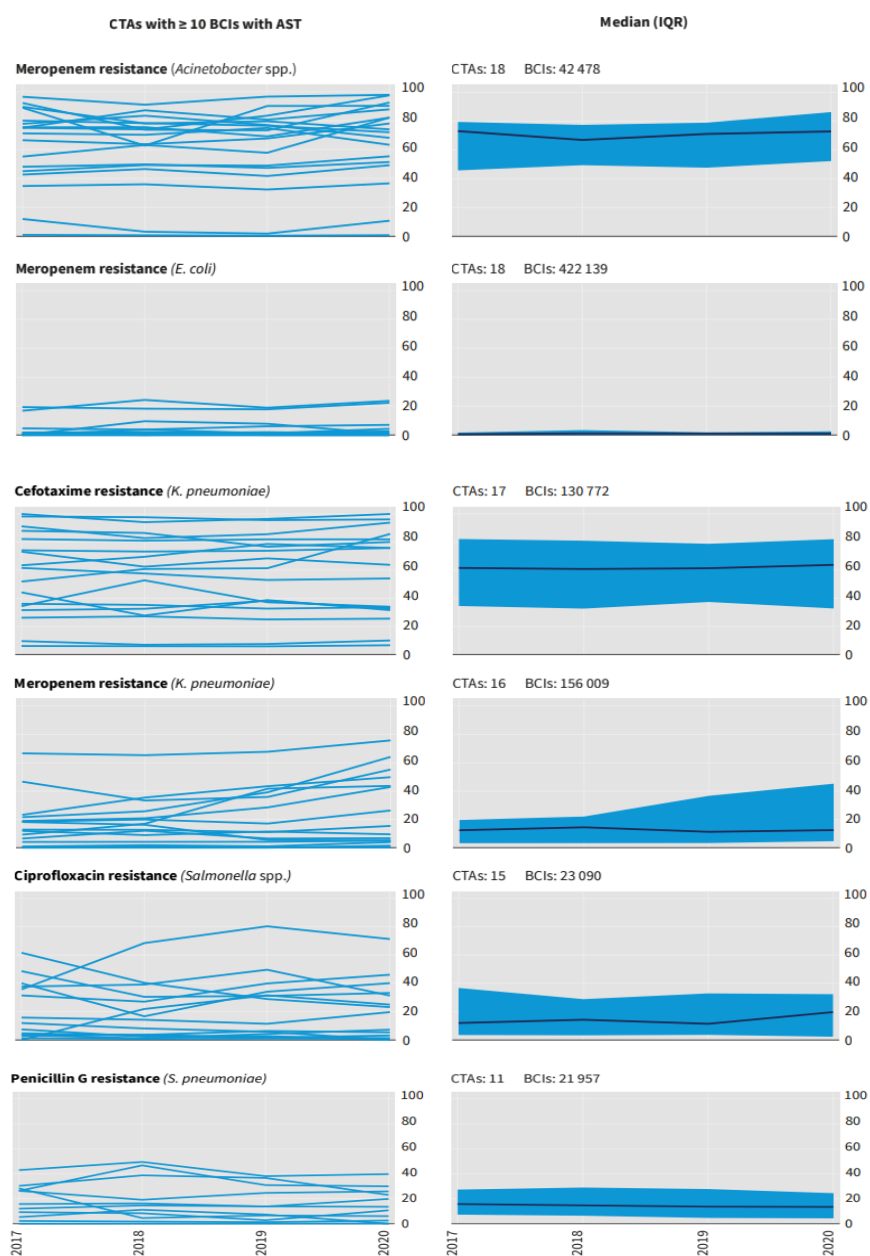


Figura 1.3.- Porcentaje de resistencia a antimicrobianos seleccionados en Centros de Tratamiento de Antimicrobianos (CTAs) que informan ≥ 10 de infecciones en el torrente sanguíneo (BCI) con resultados AST anualmente, Reporte GLASS (2017-2020).

2. OBJETIVOS:

Los objetivos del trabajo son los siguientes:

- 1) Participar en el proyecto Micromundo asistiendo al menos a un centro de Educación Secundaria Obligatoria, colaborando en facilitar el acceso a la cultura científica y la investigación en niveles educativos preuniversitarios, con el fin de fomentar el interés y la vocación hacia la ciencia mediante el empleo de una estrategia de "crowdsourcing" orientada hacia la identificación de potenciales agentes antibacterianos.
- 2) Generar una colección de cepas bacterianas con capacidad productora de agentes con antibiosis, a partir de las muestras analizadas en el programa de estudio.
- 3) Clasificar una colección de cepas bacterianas obtenidas del proyecto Micromundo mediante la tinción de Gram y su morfología.
- 4) Enfrentar las cepas bacterianas del suelo a diferentes bacterias indicadoras para determinar la posible producción de sustancias antimicrobianas.
- 5) Determinar si la naturaleza de las sustancias antimicrobianas es proteica o son posibles antibióticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

En el contexto de experimentos microbiológicos, la preparación adecuada del material es esencial para garantizar la integridad de los resultados y minimizar la

posibilidad de contaminación. A continuación, se detalla el material utilizado en dichos experimentos:

- Tubos de Semilla Inclinado con Agar TSA (Agar Triptona – Soja) (6 mL)
- Tubos de Caldo Triptona Soja TSB (Caldo Soja Tripticaseína) (2 mL)
- Placas de Agar BHAT (aproximadamente 15 mL por placa)
- Sobrecapas BHAT en Tubos (6 mL)
- Tubos Eppendorfs Estériles de 1.5 mL
- Agua Destilada y Solución Salina al 0.85%

3.2 Aislamiento de las bacterias de suelo

Durante la primera visita al centro educativo, cada pareja de estudiantes recibió un kit que incluía un tubo Falcon, una espátula, guantes desechables y una ficha de recolección de datos. Esta ficha requería que los estudiantes proporcionaran información detallada sobre la localización específica de la muestra, la profundidad del suelo, las características del entorno, las coordenadas geográficas, entre otros datos relevantes. Se les encomendó recolectar la tierra preferiblemente del campo y evitar macetas.

Durante la segunda visita al centro educativo, se procedió con la recepción de las muestras de suelo proporcionadas por los alumnos participantes. Posteriormente, se llevaron a cabo las diluciones seriadas de las muestras de suelo con el fin de obtener colonias bacterianas suficientemente separadas para ser aisladas con facilidad en el siguiente paso del experimento.

Una vez completadas las diluciones seriadas, con factores de dilución de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} y 10^{-5} , se extrajeron alícuotas de 100 μ L de cada dilución preparada y se sembraron en placas de agar TSA (Triptona Soja Agar) para asegurar su crecimiento.

Las placas de agar TSA se incubaron a una temperatura de 30 °C durante un período de 24 horas (Overnight). Este proceso permitió la proliferación y el desarrollo de las colonias microbianas presentes en las muestras de suelo, facilitando así su posterior conteo y caracterización.

3.3 Detección de halos por antibióticos

Durante la tercera visita al centro educativo, los alumnos procedieron a seleccionar 20 cepas bacterianas que habían proliferado en las placas de cultivo. Estas cepas fueron inoculadas en dos tipos de placas de agar TSA (Tryptona Soja Agar) detalladas a continuación.

Placa "madre" (Figura 3.4): En primer lugar, se sembraron en una placa de agar TSA, designada como placa madre, que proporciona un inóculo protegido para las cepas, permitiendo su mantenimiento a lo largo del tiempo y su posterior utilización en experimentos adicionales. Además, las colonias elegidas se sembraron en una segunda placa de agar TSA previamente inoculada con una bacteria de tipo Gram-positiva similar a alguna del grupo ESKAPE, con la particularidad de ser inocua y obtenida de la colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Sociedad Española de Microbiología) (Figura 3.5).

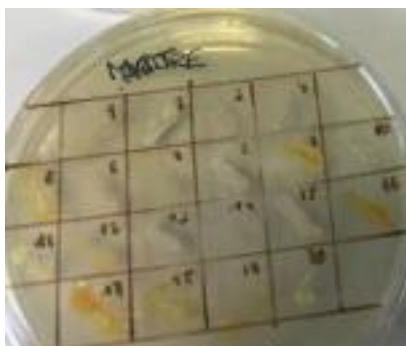


Figura 3.4: Placa madre



Figura 3.5: Placa ESKAPE

Este proceso se llevó a cabo utilizando palillos esterilizados para la inoculación, los cuales se utilizaron para recoger una pequeña porción de la colonia bacteriana de nuestras placas de las diluciones seriadas de TSA obtenidas por los estudiantes y transferirla a la nueva placa de agar TSA. Posteriormente, las placas se incubaron a una temperatura constante de 37 °C durante un período de 24 horas en una cámara de incubación. En el último día se llevan las placas al centro educativo para que los alumnos observen los halos de inhibición que se han producido.

3.4 Aislamiento de bacterias productoras de antibióticos

Una vez obtenida la placa madre, que actúa como control, y las placas donde se han observado halos de inhibición frente a bacterias Gram positivas o Gram negativas, se procede a la transferencia de las colonias bacterianas desde la placa madre hacia nuevas placas de agar BHAT (Brain Heart Infusion Agar tamponado a pH 7). Este medio de cultivo permite discernir si los halos observados son el resultado de la actividad antibiótica de las cepas o simplemente indican la producción de ácidos por parte de las mismas. Antes de la inoculación, se realiza una siembra de otras cepas bacterianas para formar un césped bacteriano, siguiendo el mismo procedimiento empleado en las placas de agar TSA. Las cepas bacterianas empleadas en este proceso son de nivel de seguridad 1 de los géneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Listeria*, *Bacillus*, *Proteus* y *Klebsiella*.

Además se procede a guardar las bacterias obtenidas de la placa madre en criotubos con glicerol para ser congeladas para su posterior utilización.

3.5 Tinción de Gram y visualización de morfología

Una vez obtenidos los halos en las placas utilizando medio TSA (Agar Triptona Soja) y BHAT (Brain-Heart Agar Tamponado), se procede a la obtención de muestras de colonias bacterianas. Estas muestras son sometidas a tinción de Gram para determinar su morfología y clasificación como bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Las bacterias se hacen crecer en TSB a 37°C 24h. Una vez que las colonias han crecido en los tubos de cultivo, se transfieren a nuevos tubos con medio TSA y se vuelven a inocular para obtener colonias frescas. Estos tubos son luego incubados durante 24 horas a 37°C.

Posteriormente, las colonias obtenidas se manipulan utilizando un asa de siembra esterilizada. Se toma una muestra de la colonia y se coloca en un portaobjetos sobre una gota de agua, extendiéndola uniformemente. La muestra se deja secar y luego se fija utilizando la llama de un mechero Bunsen. Se procede a realizar la tinción de Gram, cubriendo la muestra con cristal violeta durante 2 minutos, seguido de la adición de Lugol durante otros 2 minutos. Después de retirar el exceso, se añade alcohol y se deja actuar durante 10 a 15 segundos, seguido de la adición de safranina durante 2 minutos. Finalmente, la

muestra se enjuaga con agua y se seca para su observación bajo microscopio óptico.

Es importante destacar que algunas bacterias pueden presentar variabilidad en la tinción Gram debido a condiciones ambientales o características propias. Además, no todas las bacterias pueden ser teñidas por este método, como aquellas que carecen de pared celular o tienen una composición química diferente y además se usa para discernir la morfología de la cepa bacteriana (López *et al.* 2014).

3.6 Ensayo para comprobar la posible actividad antimicrobiana. Ensayo por gota sobre césped.

Se utilizó un asa Drigalsky para crear un césped bacteriano uniforme, seguido de la inoculación de 5 µL de cada bacteria de interés en medio de cultivo TSB. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Tras la incubación, se observó el crecimiento tanto de la bacteria indicadora como de las bacterias de suelo y se pudo apreciar en diferentes casos la aparición de halos de inhibición. Es importante destacar que, para considerar un resultado positivo en la prueba de halos bacterianos, solo se tuvieron en cuenta las placas que presentaron dos o tres halos, descartando las placas con un solo halo, ya que suelen ser falsos positivos. Esto permitió minimizar posibles errores en la interpretación de los resultados.

3.7 Ensayo de tripsina

En primer lugar, se inoculan las cepas bacterianas con capacidad antimicrobiana o inhibitoria en tubos con caldo de Triptona Soja (TSB) y se incuban durante 24 horas a 37 °C.

Posteriormente se inocularon placas de agar BHAT con gotas de cinco microlitros de las bacterias aisladas del suelo, seguido de incubación a 30 °C durante 24 horas. Simultáneamente, se inocularon tubos de TSB con las cepas indicadoras de bacterias ESKAPE para su posterior uso en las sobrecapas.

Tras las 24 horas, se procede a la preparación de la tripsina. Esta enzima proteolítica se diluye en agua destilada, asegurando una homogeneización adecuada. Se añade una gota de 5 µL de tripsina al lado de cada gota de bacteria

en las placas de agar BHAT, y se incubó durante 3 horas a 37°C para permitir la acción enzimática.

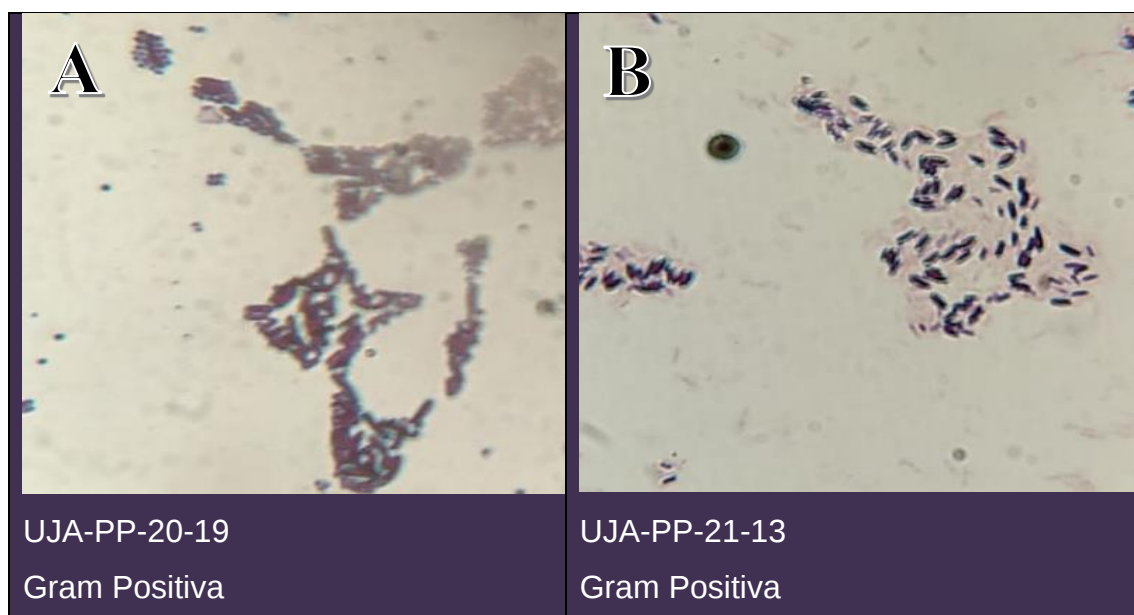
Tras el periodo de incubación, se añadieron las sobrecapas de BHAT con las cepas indicadoras a las placas y se incubaron nuevamente a 37°C durante 24 horas para completar la evaluación. Las sobrecapas fueron calentadas en un baño María para fundir el agar, posteriormente atemperadas en un baño y se inoculaban rápidamente con las bacterias indicadoras para posteriormente ser distribuidas uniformemente encima de nuestras placas de BHAT. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de este tiempo, se observan dos tipos de halos:

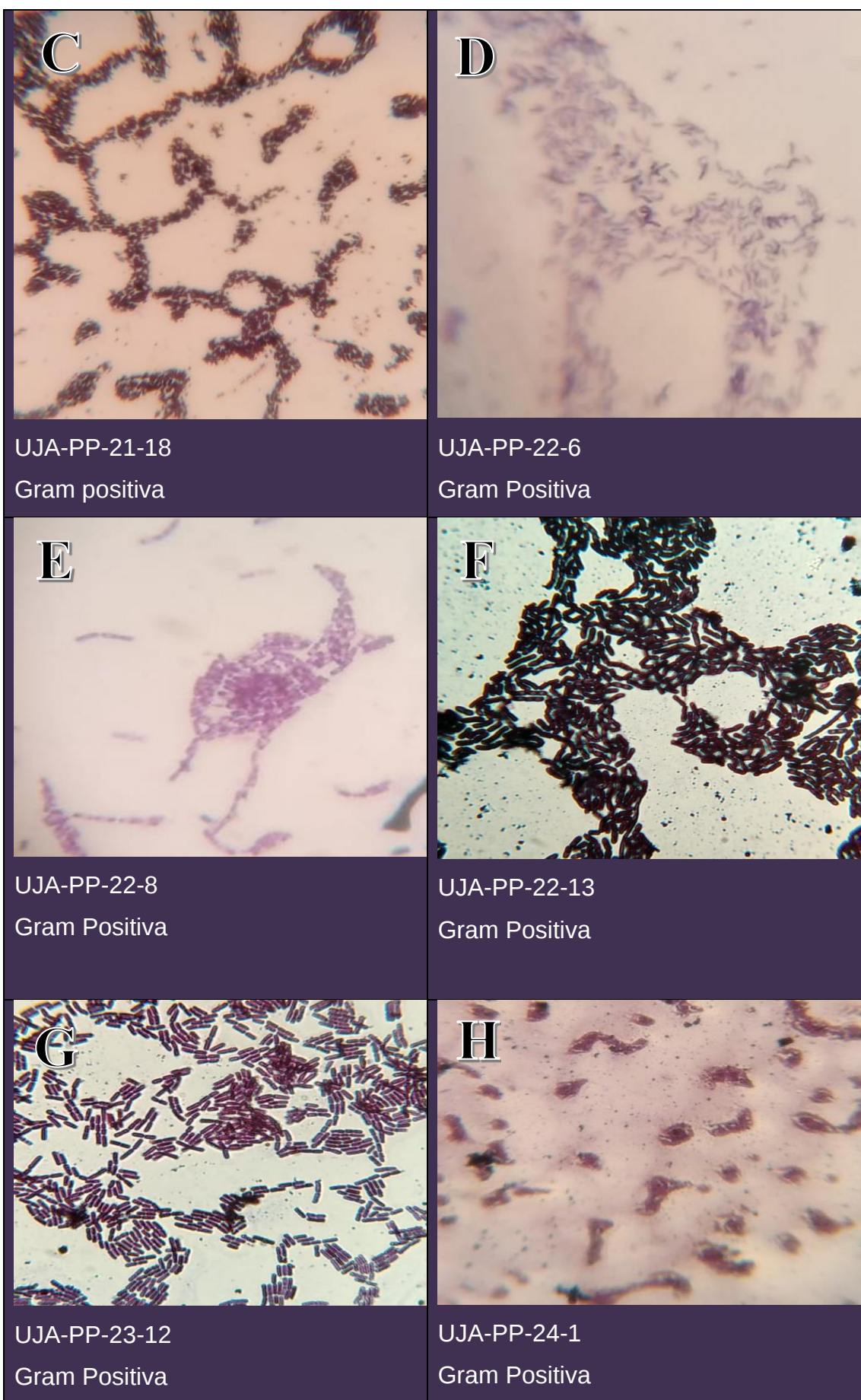
- Un halo completo que indica una reducción del crecimiento de la cepa bacteriana.
- Un halo incompleto por la adición de la tripsina.

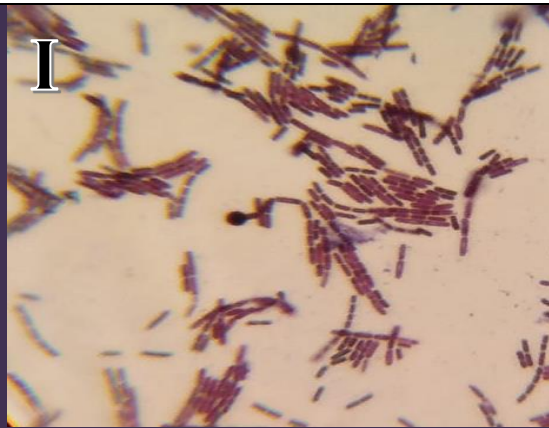
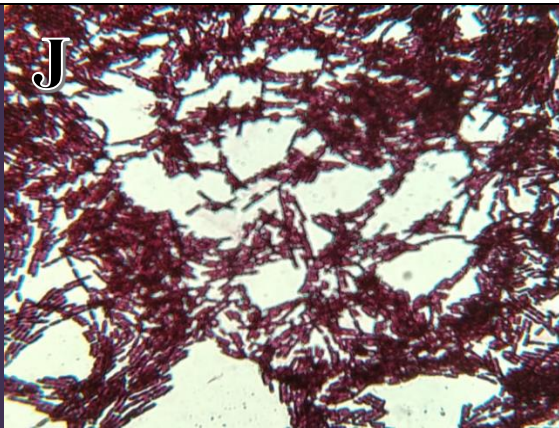
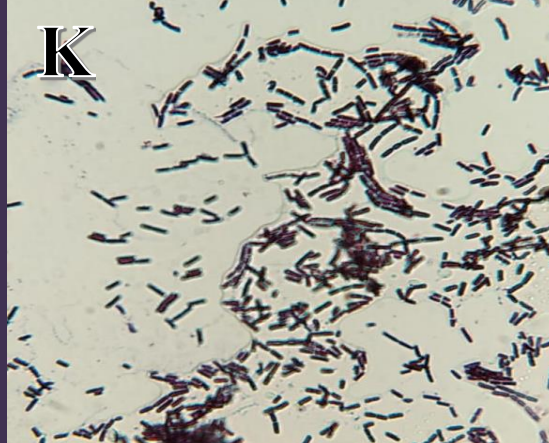
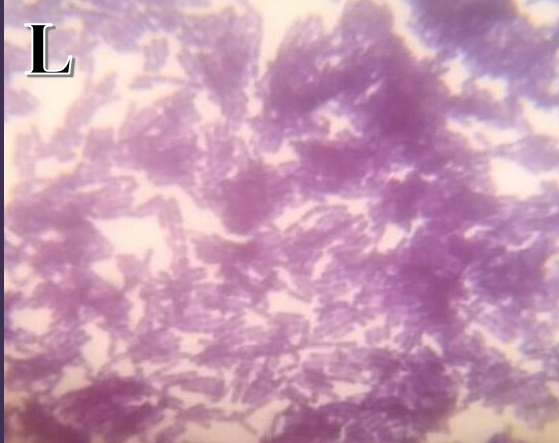
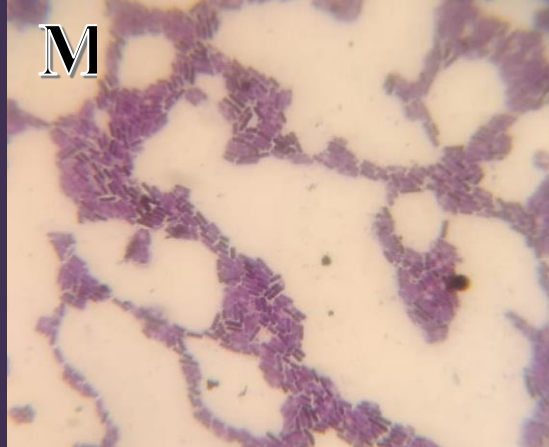
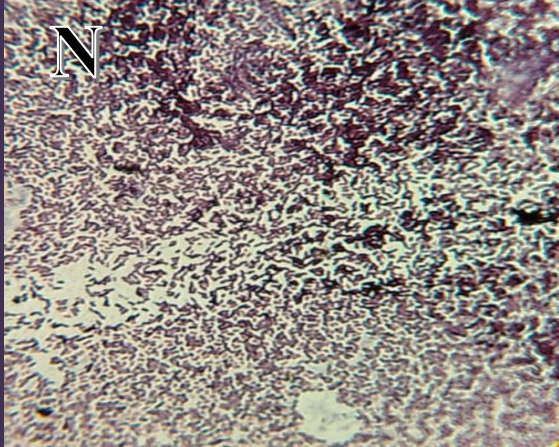
4. RESULTADOS

4.1 Resultados de la tinción de Gram:

Se obtuvieron un total de 20 cepas bacterianas de las cuales 19 son Gram Positivas y 1 es Gram Negativa, siendo esta la Figura 4.6-O.





	
UJA-PP-24-4 Gram Positiva	UJA-PP-24-12 Gram Positiva
	
UJA-PP-24-13 Gram Positiva	UJA-PP-24-14 Gram Positiva
	
UJA-PP-24-18 Gram Positiva	UJA-PP-25-1 Gram Positiva

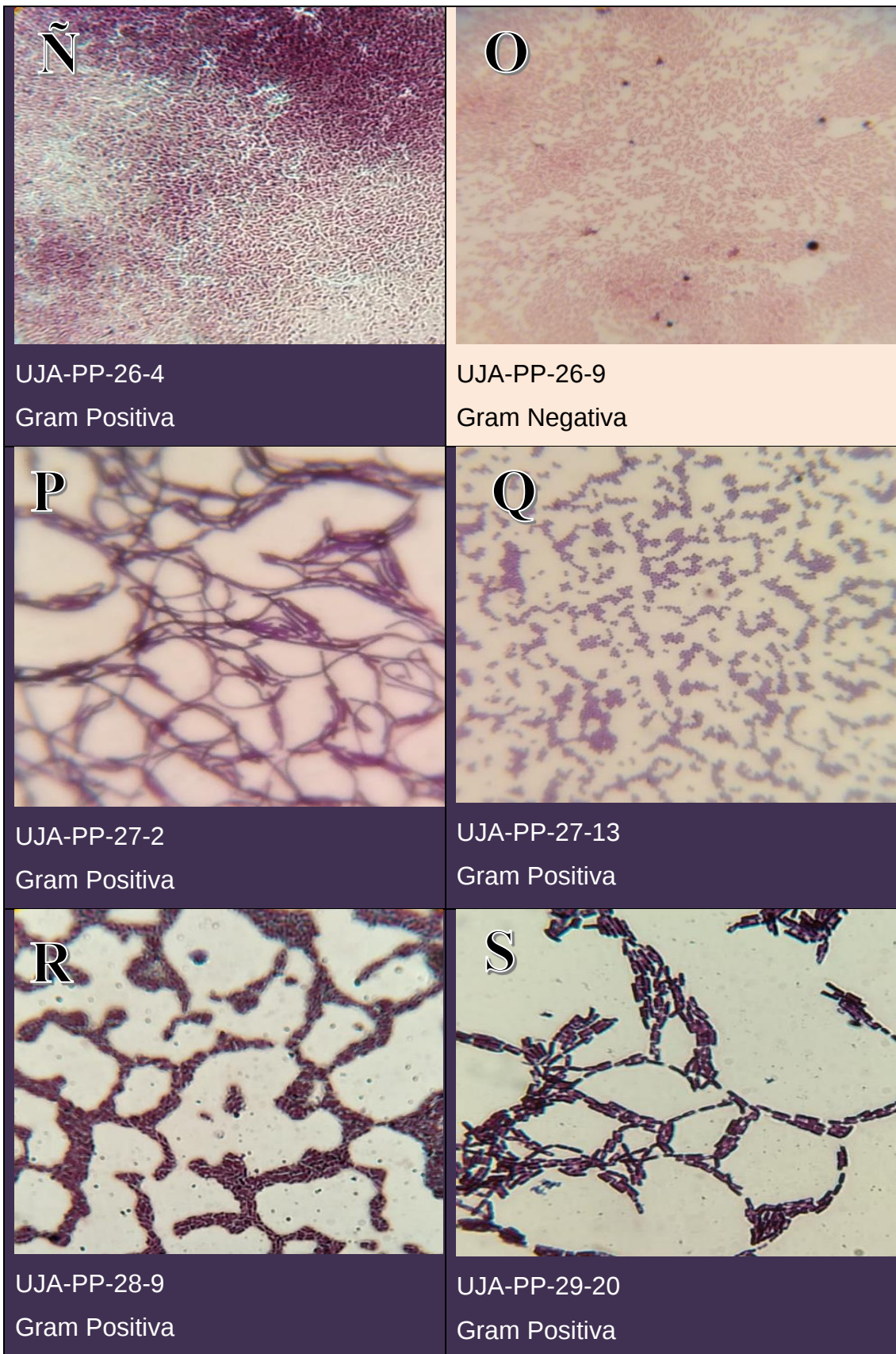


Figura 4.6: Resultados de la tinción de Gram. Elaboración propia.

4.2 Resultados de la prueba de la gota:

De las 20 cepas bacterianas, 6 no fueron capaces de producir una reducción en el crecimiento de las bacterias ESKAPE y de las 14 resultantes, 14 cepas fueron activas frente a *Staphylococcus*, 11 frente a *Bacillus*, 8 frente a *Listeria* , 3 frente a *Eshrerichia*, 2 frente a *Proteus* y 2 frente a *Klebsiella*.

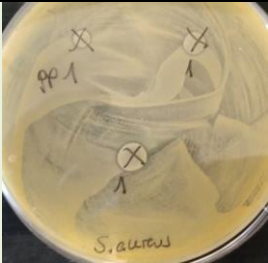
Código		Staphylococcus	
UJA-PP-20-19	PP1		

Figura 4.7: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-20-19, PP1. Elaboración propia.

Código		Staphylococcus	Klebsiella	Escherichia
UJA-PP-21-13	PP2			

Figura 4.8: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-21-13, PP2. Elaboración propia.

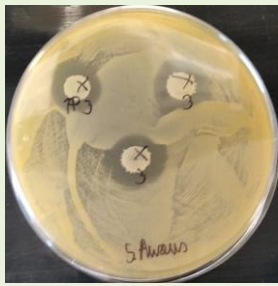
Código		Staphylococcus	Listeria	Bacillus
UJA-PP-21-18	PP3			

Figura 4.9a: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-21-18, PP3. Elaboración propia.

Código		<i>Proteus</i>	<i>Escherichia</i>
UJA-PP-21-18	<u>PP3</u>		

Figura 4.9b: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-21-18, PP3. Elaboración propia.

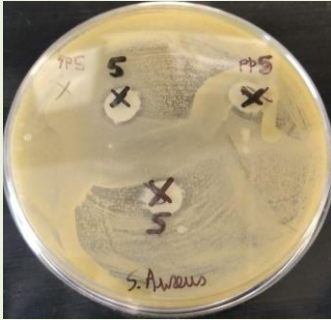
Código		<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i>
UJA-PP-22-8	<u>PP5</u>		

Figura 4.10: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-22-8, PP5. Elaboración propia.

Código		<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i>
UJA-PP-22-13	<u>PP6</u>		

Figura 4.11: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-22-13, PP6. Elaboración propia.

Código		Staphylococcus	Listeria
UJA-PP-23-12	PP7		

Figura 4.12: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-23-12, PP7. Elaboración propia.

Código		Staphylococcus
UJA-PP-24-1	PP8	

Figura 4.13: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-24-1, PP8. Elaboración propia.

Código		Staphylococcus	Listeria	Bacillus
UJA-PP-24-4	PP9			

Figura 4.14: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-24-4, PP9. Elaboración propia.

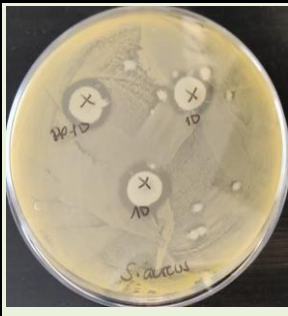
Código		Staphylococcus	Listeria	Bacillus
UJA-PP-24-12	PP10			

Figura 4.15: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-24-12, PP10. Elaboración propia.

Código		Staphylococcus	Bacillus
UJA-PP-24-13	PP11	PP11. Staphylococcus	

Figura 4.16: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-24-13, PP11. Elaboración propia.

Código		Staphylococcus	Bacillus
UJA-PP-24-14	PP12	PP12. Staphylococcus	

Figura 4.17: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-24-14, PP12. Elaboración propia.

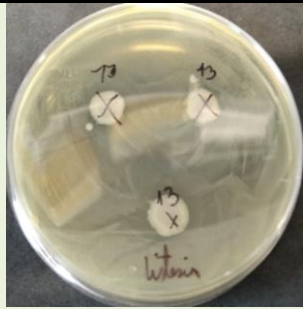
Código		Staphylococcus	Listeria	Bacillus
UJA-PP-24-18	PP13	PP13. Staphylococcus		

Figura 4.18: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-24-18, PP13. Elaboración propia.

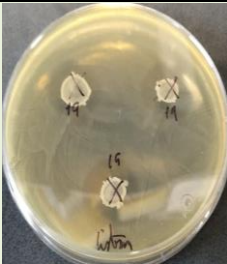
Código		Staphylococcus	Listeria	Bacillus
UJA-PP-28-9	PP19			

Figura 4.19a: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-28-9, PP19. Elaboración propia.

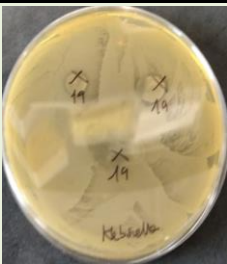
Código		Proteus	Klebsiella	Escherichia
UJA-PP-28-9	PP19			

Figura 4.19b: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-28-9, PP19. Elaboración propia.

Código		Staphylococcus	Bacillus
UJA-PP-29-20	PP20	PP20- Staphylococcus	

Figura 4.20: Resultados de la prueba de la tripsina, UJA-PP-29-20, PP20. Elaboración propia.

4.3 Resultados de la prueba de la tripsina

Se contaron un total de 4 posibles antibióticos y 2 posibles bacteriocinas (Con naturaleza proteica) plasmados en la Tabla recopilatoria (Tabla 4.1). El resto de resultados de esta prueba son inconclusos por crecimiento descontrolado de las bacterias.

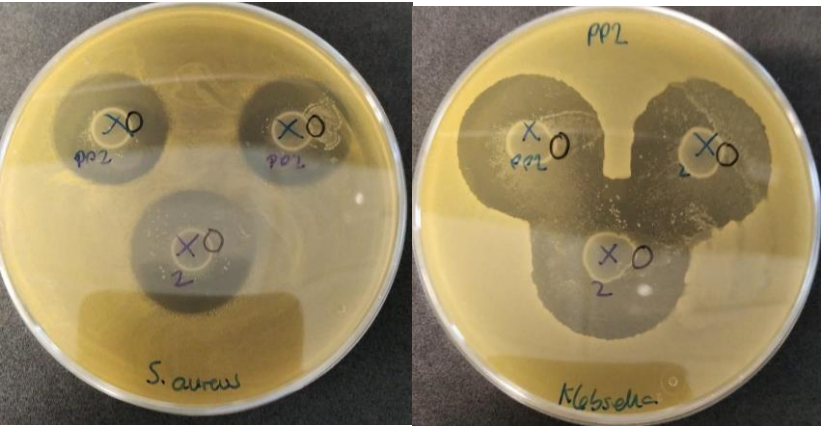


Figura 4.21.- Ejemplos de resultados negativos en la prueba de la tripsina.

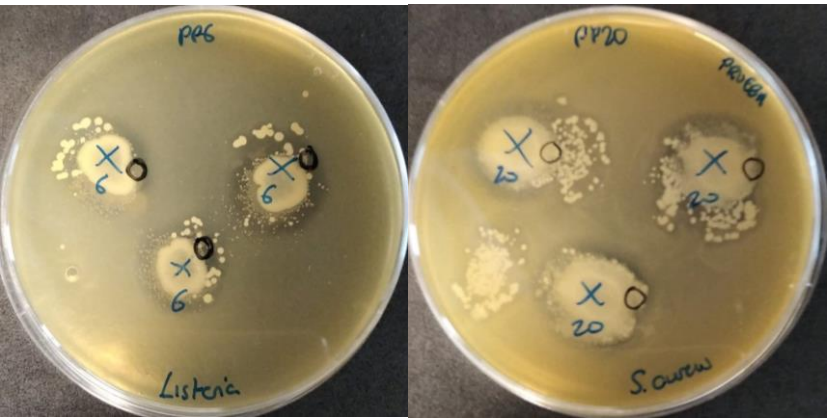


Figura 4.22.- Ejemplos de resultados positivos en la prueba de la tripsina.

A continuación se presenta una Tabla en la que se recopilan todos los resultados obtenidos en el presente trabajo:

Tabla 4.1- Tabla de recopilación de los resultados. Elaboración propia

Instituto Pedro Poveda-PP									
Código	Coloración	Morfología	Medio BHAT						Naturaleza Proteica
			Gram +	Gram +	Gram +	Gram -	Gram -	Gram -	
			Staphylococcus	Listeria	Bacillus	Proteus	Klebsiella	Escherichia	
UJA-PP-20-19	Gram +	Bacilos grandes	halo						Halo dudoso

UJA-PP-21-13	Gram +	Bacilos					halo	halo	Posible antibiótico
UJA-PP-21-18	Gram +	Bacilos pequeños	halo	halo	halo	halo		halo	Posible antibiótico
UJA-PP-22-6	Gram +	Bacilos cortos							Posible antibiótico
UJA-PP-22-8	Gram +	Bacilos esporulados	halo		halo				Halo dudoso
UJA-PP-22-13	Gram +	Bacilos grandes	halo	halo	halo				Halo dudoso
UJA-PP-23-12	Gram +	Bacilos grandes	halo	halo					Posible bacteriocina
UJA-PP-24-1	Gram +	Bacilos cortos	halo						Posible antibiótico
UJA-PP-24-4	Gram +	Bacilos largos	halo	halo	halo				Halo dudoso
UJA-PP-24-12	Gram +	Bacilos grandes	halo	halo	halo				Halo dudoso
UJA-PP-24-13	Gram +	Bacilos grandes	halo	halo	halo				Halo dudoso
UJA-PP-24-14	Gram +	Bacilos grandes	halo		halo				Halo dudoso
UJA-PP-24-18	Gram +	Bacilos pequeños	halo	halo	halo				Halo dudoso
UJA-PP-25-1	Gram +	Bacilos cortos	halo		halo				Halo dudoso
UJA-PP-26-4	Gram +	Cocobacilos							Halo dudoso
UJA-PP-26-9	Gram -	Bacilos							Halo dudoso
UJA-PP-27-2	Gram +	Bacilos largos en cadena							Halo dudoso

UJA-PP-27-13	Gram +	Cocobacilos en racimos							Halo dudoso
UJA-PP-28-9	Gram +	Bacilos cortos	halo	halo	halo	halo	halo	halo	Posible bacteriocina
UJA-PP-29-20	Gram +	Bacilos grandes	halo		halo				Halo dudoso

5. DISCUSIÓN:

Como se puede observar en la figura 4.6, tan solo una de las numerosas cepas bacterianas extraídas del suelo presentan coloración rosada propia de Gram negativa, siendo esta la Figura 4.6-O (UJA-PP-26-9). Esto es algo común en el ámbito de la búsqueda de nuevos antibióticos ya que las productoras de antibacterianos Gram negativas son menos comunes que las Gram positivas. En cuanto a la morfología cabe destacar la tendencia hacia los bacilos, tan solo dos de las 20 cepas bacterianas cuentan con una morfología de cocobacilos, siendo estas UJA-PP-26-4 visible en la Figura 4.6-Ñ y UJA-PP-27-13 visible en la Figura 4.6-Q

Solo esta información no es suficiente para identificar las cepas bacterianas, por lo que más pruebas serían necesarias para su determinación como, por ejemplo, la secuenciación del 16S.

En cuanto a la prueba por gota, con resultados visibles de la Figura 4.7 a la Figura 4.20, una gran cantidad de bacterias han producido sustancias capaces de frenar el crecimiento de alguna de las bacterias ESKAPE utilizadas en el experimento (*Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Bacillus* y *Listeria*). De todas las bacterias de suelo utilizadas, 15 fueron las que produjeron algún tipo de halo frente a las ESKAPE. En la Figura 5.23 se puede observar cómo *Bacillus* es el género frente al que más antibiosis se ha detectado, después de *Staphylococcus*, que como fue explicado anteriormente, es la bacteria usada para la detección de halos bacterianos en los institutos por lo que, como ocurre en este caso, se da en todos los casos que NO fueron falsos positivos (UJA-PP-22-6, UJA-PP-25-1, UJA-PP-26-4, UJA-PP-26-9, UJA-PP-27-2 y UJA-PP-27-13). Hay muchos menos casos de antibiosis frente tanto a *Escherichia*, como *Proteus* y *Klebsiella*.

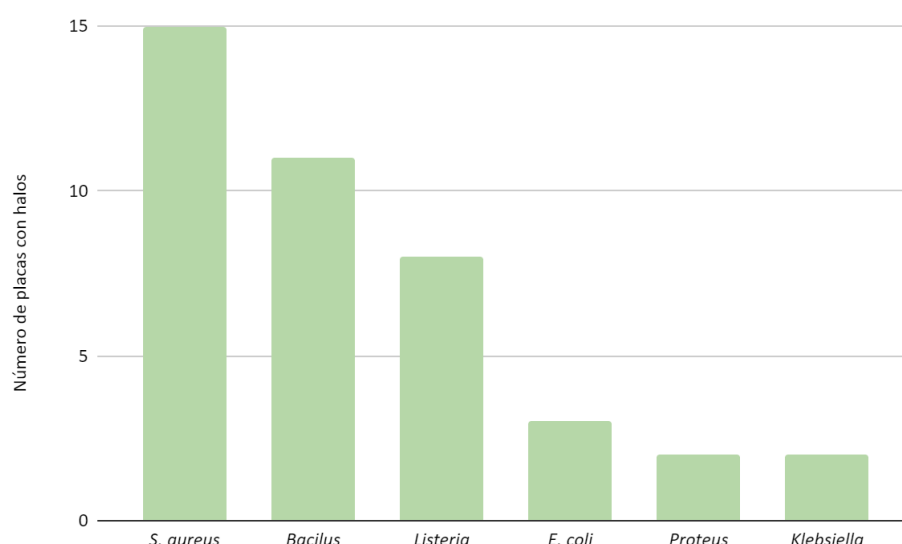


Figura 5.23.-Número de halos bacterianos por tipo de bacteria ESKAPE. Elaboración propia

Al comparar los resultados de este trabajo con otros publicados, se puede observar el aumento considerable de las bacterias productoras de sustancias antibacterianas de este año con respecto a los años anteriores. Llama sobre todo la atención la presencia de *Klebsiella* y *Escherichia*, los cuales se encontraban ausentes el año anterior.

Tomando en cuenta de donde se han obtenido las muestras podemos comprobar darnos cuenta de un dato interesante, y es que las bacterias obtenidas de suelos no abonados tienen mayor índice de halos de un 42 % más frente a las encontradas en macetas y similares, lo cual está respaldado por el trabajo de Cobo y colaboradores (Cobo *et al*, 2018).

Tabla 5.2. Comparación de los resultados de este año 2023-2024 con los del año anterior 2022-2024. Elaboración propia.

Bacteria	2023-2024		2022-2023		Aumento
	Porcentaje	Placas totales	Porcentaje	Placas totales	
<i>Staphylococcus</i>	75%	20	33,33%	15	42%
<i>Listeria</i>	55%	20	6,66%	15	48%
<i>Bacillus</i>	40%	20	13,66%	15	26%
<i>Proteus</i>	15%	20	6,66%	15	8%
<i>Klebsiella</i>	10%	20	0%	15	10%
<i>Escherichia</i>	10%	20	0%	15	10%

En cuanto a la prueba de la tripsina, se puede decir que tanto UJA-PP-23-12 y UJA-PP-28-9 son posibles bacteriocinas, ya que se puede observar una reducción del halo donde la gota de tripsina fue inoculada. Tanto UJA-PP-24-1 como UJA-PP-22-6, UJA-PP-21-18 y UJA-PP-21-13 son posibles antibióticos ya que fueron capaces de generar un halo claro. El resto de bacterias tuvieron un halo muy difuso como para poder ver la actividad de la tripsina.

Para terminar sería interesante recalcar dos bacterias que me han llamado la atención, la bacteria UJA-PP-28-9 y la bacteria UJA-PP-21-18. La bacteria UJA-PP-21-18 genera halos en todas las bacterias indicadoras exceptuando *Klebsiella* y además no tiene naturaleza proteica, cosa que no ocurre con la bacteria UJA-PP-28-9, la cual es muy similar a esta, con la diferencia de que la sustancia que genera sí que tiene naturaleza proteica.

Como resumen, se ha conseguido aislar una gran cantidad de bacterias productoras de posibles antibióticos, llamando más la atención la bacteria UJA-PP-21-18 gracias a su gran rango de acción. Esto abre la posibilidad de obtener alguna nueva sustancia de estas bacterias obtenidas gracias a los alumnos del centro educativo *Pedro Poveda (Las Teresianas)*, con las que enfrentar el desafío emergente de la resistencia a los antibióticos, que, si continúa a la velocidad a la que lo hace actualmente, podría arrojar a la medicina contemporánea a la sombra de una era preantibiótica.

"Hay reglas sencillas para el uso de la penicilina: usarla sólo para los microbios que sean vulnerables a ella, aplicar la dosis indicada y que el tratamiento dure lo suficiente para eliminar la infección; siguiendo estas reglas, todos quedarán satisfechos; de lo contrario, el resultado será decepcionante".- Alexander Fleming.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha participado en el proyecto Micromundo, asistiendo a dos centros de Educación Secundaria Obligatoria: *Colegio concertado Pedro Poveda (Las Teresianas)* y *IES Az-Zait*, colaborando en la divulgación de la cultura científica y la investigación en niveles educativos preuniversitarios, participando un total de 26 alumnos

SWITA (20 en *Las Teresianas* y 6 en *IES Az-Zait*) y un total de 42 alumnos preuniversitarios.

2. Se ha generado una colección de 15 cepas bacterianas con capacidad productora de agentes con antibiosis, a partir de las muestras analizadas en el programa de estudio.
3. Todas las cepas estudiadas menos una (UJA-PP-26-9) se tiñen como Gram-positivas, siendo dos de estas cepas cocobacilos (UJA-PP-26-4 y UJA-PP-27-13) y las demás bacilos de distintos tamaños y agrupaciones.
4. Al enfrentar las cepas bacterianas del suelo a diferentes bacterias indicadoras para determinar la posible producción de sustancias antimicrobianas, se han obtenido 14 cepas activas frente a *Staphylococcus*, 11 frente a *Bacillus*, 8 frente a *Listeria*, 3 frente a *Eshrerichia*, 2 frente a *Proteus* y 2 frente a *Klebsiella*.
5. Dos cepas productoras han mostrado tener naturaleza proteica (UJA-PP-23-12 y UJA-PP-28-9), cuatro han presentado indicios de ser posibles antibióticos (UJA-PP-21-13, UJA-PP-21-18, UJA-PP-22-6 y UJA-PP-24-1), y las demás son dudosas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acebo, A. (1970, January 1). Suelos productivos, Suelos Vivos. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?Codigo=7418001>
- Bush, L. M. (2023). Infecciones por enterococos - enfermedades infecciosas. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos>
- Camacho Assef, V. (2005). Los antimicrobianos en la práctica médica. Infomed Red de salud de Cuba, <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/urgencia/antibioticos.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP)

- Choez, X. S. (1970, January 1). USO racional de antibióticos en infecciones del Tracto Respiratorio Superior en el Nivel de Atención en Salud en el Ecuador. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?Codigo=299414>
- Cobo, A., Pérez, R., Grande, M., Lucas, R., Martínez, A., Gálvez, A., y otros. (2018). ESTUDIOS DE BIODIVERSIDAD MICROBIANA EN EL MARCO DEL PROGRAMA SMALL WORLD INITIATIVE EN JAÉN. IV Reunión de Docencia y Difusión de la Microbiología. Madrid.
- Iglesias, M., & semmoderador. (2024, February 8). El Proyecto Micromundo. Sociedadespañola de Microbiología. <https://www.semicrobiologia.org/noticias/el-proyecto-micromundo>
- Khedher, B. H. K. A. D. T. H. (2011). [virulence factors in pseudomonas aeruginosa: Mechanisms and modes of regulation]. Annales de biologie clinique. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21896403/>
- LOPARDO, H. A., PREDARI, S. C., & VAY, C. (2014). Parte 2 C 1 enterobacterias. MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA. <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en discapacidad, 3(1), 10-18.
- Micromundo. (2023, July 3). De La Tierra Al Laboratorio. Micro Mundo USAL. <https://swiusal.wixsite.com/micromundousal/post/de-la-tierra-al-laboratorio>
- Neely, A. N., & Maley, M. P. (2000, February). Survival of Enterococci and *Staphylococci* on hospital fabrics and plastic. Journal of clinical microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86187/#:~:text=Data%20in%20this%20study%20indicate,used%20hospital%20fabrics%20and%20plastic.&text=casseliflavus%2C%20on%20fabrics%20and%20plastic,survival%20on%20other%20hospital%20surfaces.>

- Oliveira, D., Walker, B., Forde, K. T., Paterson, S., Beatson, A., & Harris, P. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32404435/>
- Oliver, A., & Cantón, R. (2016). Lactamasas plasmídicas de Espectro Extendido. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS DE ESPECTRO EXTENDIDO. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
- OMS, O. (2020). Resistencia a Los Antibióticos. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Oromí Durich, J. (2000, December 1). Resistencia bacteriana a Los Antibióticos. *Medicina Integral*. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-losantibioticos-10022180#:~:text=La%20resistencia%20de%20las%20bacterias,se%20habla%20de%20resistencia%20natural>
- Oviedo Córdoba, H., Cortina Navarro, C., Osorio Coronel, J. A., & Romero Torres, S. M. (2017). Realidades de la Práctica de la automedicación en Estudiantes de la universidad del magdalena. *Enfermería Global*. https://scielo.isciii.es/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1695-61412021000200016
- Pendleton JN;Gorman SP;Gilmore, B. (2024). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert review of anti-infective therapy. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23458769/>
- Pérez, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Su Importancia ... Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. <https://www.sanidad.gob.es/bibliopublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- Reina, R., León-Moya, C., & Garnacho-Montero, J. (2022, December 1). Tratamiento de Infecciones Graves por acinetobacter baumannii. *Medicina Intensiva*. <https://www.medintensiva.org/es-tratamiento-infecciones-graves-por-acinetobacter-articulo-S0210569122002844>

- Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2017). Kpc: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Revista chilena de infectología*. [Http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476](http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476)
- World Health Organization. (n.d.). Glass report: Early implementation 2017-2018. World Health Organization. [Https://www.who.int/publications/i/item/9789241515061](https://www.who.int/publications/i/item/9789241515061)