

## “Evolución: adquisición de resistencia a antibióticos en bacterias”

STEFANO BOCHICCHIO, TONATIUH LIÉVANO, FEDERICO OECHLER, EMILIO SOBERÓN

[colegio@marymount.edu.mx](mailto:colegio@marymount.edu.mx)

### Resumen:

Nuestro proyecto consistió comprobar que la evolución existe mediante la aplicación de una presión selectiva, el antibiótico estreptomina, a una cepa de la bacteria *Escherichia coli*. Primero cultivamos las bacterias en un medio de cultivo (Luria broth) sólido con una concentración de estreptomina de 0, 20, 30, 50 µg/ml, al no obtener colonias resistentes hicimos gradientes con concentraciones de 0 a 20 µg/ml de estreptomina y las inoculamos con las bacterias. Las bacterias resistentes las pasamos a cajas petri con diferentes concentraciones de estreptomina (20 a 100 µg/ml de estreptomina). Sólo sobrevivieron hasta una concentración de 30 µg/ml. A una concentración de 20 µg/ml, obtuvimos un promedio de 100 colonias resistentes y a una concentración de 30 µg/ml obtuvimos 60 colonias resistentes. Pudimos observar como opera la evolución ya que las bacterias resistentes adquirieron modificaciones en su material genético que les permitieron sobrevivir y reproducirse.

### Introducción

La evolución es el cambio de la composición genética en una población a través del tiempo. Se puede considerar que actúa de dos maneras; la generación de variabilidad y la selección de las combinaciones de genes más aptas para sobrevivir en un ambiente dado. La selección natural es el proceso responsable de la evolución de una población, el medio en que se encuentra una población específica ejerce presiones sobre los individuos de ésta.<sup>1</sup>

La variabilidad genética en las poblaciones permite que algunos de los integrantes de éstas estén mejor adaptados a sus alrededores. Los individuos menos aptos tendrán menos posibilidades de vivir y por lo tanto menos posibilidades de pasar sus genes a la siguiente generación. La supervivencia de los más aptos y su mayor éxito reproductivo hace que las poblaciones vayan evolucionando al preservarse las características que permitieron sobrevivir a los individuos que las tenían. La variabilidad genética surge de la recombinación y las mutaciones.

Las mutaciones son alteraciones en el ADN de un organismo. El ADN codifica la expresión de proteínas y determina el fenotipo de un organismo. La secuencia de los pares de bases determina la secuencia de aminoácidos en una proteína. Una mutación altera el código genético de diferentes maneras; puede que una base sea sustituida por otra, que una base se inserte en el código o que desaparezca una base. Las mutaciones generalmente no tienen ningún efecto sobre la expresión de genes en células eucariotas, ya que la mayoría del ADN no codifica para ninguna proteína y que hay redundancia en el mecanismo de lectura de codones. Éste no es el caso en las bacterias que tienen una densidad de genes mayor que las células eucariotas. Cuando una mutación ocurre en un gen, puede afectarlo. A veces, las mutaciones traen cambios positivos consigo. Esto hace que un organismo tenga ventajas sobre los otros de su especie.<sup>2</sup>

Los antibióticos inhiben el crecimiento bacteriano de diversas maneras; puede ser que interfieran con procesos metabólicos como la síntesis de proteínas o de la pared celular. La resistencia a antibióticos es la incapacidad de un antibiótico de inhibir el crecimiento bacteriano. La resistencia se produce naturalmente por selección natural a través de mutaciones producidas al azar, pero también puede inducirse artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población.<sup>3</sup> Una vez que se genera la información genética, las bacterias pueden transmitirse los nuevos genes a través de transferencia horizontal, por intercambio de plásmidos. Los plásmidos son fragmentos extra cromosómicos de ácidos nucleicos que pueden transmitir genes que confieren resistencia de antibióticos de una bacteria a otra.<sup>4</sup>

### **Antecedentes**

La teoría de la evolución fue propuesta por Jean Lamarck. En ésta, basándose en la observación de fósiles, planteó que hay un cambio en las especies a través del tiempo para poder adaptarse a su medio ambiente. Su teoría proponía que mediante el uso y desuso de los órganos, los organismos adquirirían caracteres de los cuales carecían sus progenitores. Estos caracteres eran transmitidos a la siguiente generación. Los cambios que surgían en los individuos mostraban una tendencia hacia la perfección del organismo. Cuvier y varios científicos de su época, refutaron la teoría de Lamarck. Un experimento en el que se cortaron las colas de ratones después de varias generaciones demostró que los cambios físicos no eran transmitidos a las siguientes generaciones.<sup>5</sup>

A mediados del año 1800 un naturalista inglés llamado Charles Darwin propuso la teoría de la evolución que conocemos hoy en día. Darwin visitó las islas Galápagos y se dio cuenta de algo al observar los pinzones que habitaban cada una de las islas. A pesar de que todos eran pinzones, todos tenían diferente forma y tamaño de pico. El aislamiento geográfico y los diferentes entornos a los que estaban expuestos causaron que se adaptaran a diversas condiciones de vida. En este caso, las formas de los picos habían surgido como respuesta al tipo de comida en cada una de las islas. Con esto, Darwin propuso que los organismos de una especie mejor adaptados a su entorno se reproducían y sobrevivían en mayor proporción que aquéllos que no lo estaban adaptados. Darwin planteó que los seres humanos pueden alterar el medio en el que se encuentran y así ejercer presiones sobre ellos. A la conservación de las diferencias y variaciones individualmente

favorables y la destrucción de las que son perjudiciales se le llama la selección natural o supervivencia de los más adecuados.<sup>6</sup> Aquí se muestra una cita de Darwin: “Durante el viaje del *Beagle*, me había impresionado profundamente al descubrir en la formación de las pampas el parecido entre los grandes animales fósiles cubiertos con caparazón y los armadillos existentes. Era evidente que hechos como estos, al igual que muchos otros, podían explicarse bajo el supuesto de que las especies se modificaban gradualmente; el tema me obsesionó”.<sup>7</sup>

La evolución de las poblaciones es un proceso gradual que en la mayoría de los casos toma miles de años en producir efectos visibles en estas. Las bacterias no sufren de este problema; el proceso evolutivo puede observarse fácilmente en una población gracias a su tiempo de generación, que es muy corto, (20 minutos, en *E.coli*) y a su habilidad de transmitir genes de manera horizontal por medio de plásmidos. Los plásmidos agilizan el proceso de evolución, que en este caso se va a medir como el desarrollo de resistencia a la estreptomicina, al transferirse la característica que estamos rastreando no solo a los descendientes de una célula. Las bacterias en un espacio muy reducido. También son fáciles de alimentar.

La finalidad de nuestro proyecto de investigación es demostrar que la evolución modifica a las poblaciones por medio de selección natural.

Según un estudio hecho sobre la resistencia a antibióticos de las bacterias ha creado cepas que son completamente resistentes, asimismo se deben de crear diferentes antibióticos para destruir un cierto tipo de bacterias resistentes. Entre las bacterias resistentes más comunes se encuentran las que causan neumonía y sinusitis, algunas que causan infección y acumulación de pus en la boca y finalmente, están los enterococos los cuales causan infecciones gastrointestinales, en las vías respiratorias y urinarias y en la piel.<sup>8</sup>

Un estudio de la Universidad de Chile<sup>9</sup> reveló que hay grandes pérdidas económicas ya que en la producción animal se utilizan bastantes antibióticos y las bacterias de los animales ya eran resistentes a ese tipo de antibióticos. Según la Profesora Betty San Martín, directora de la Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile: “a resistencia es un mecanismo que se activa cuando una bacteria se expone por mucho tiempo a los antibióticos y comienza a mutar genéticamente para volverse resistente. Entonces, el antibiótico deja de ser efectivo” En Europa se han hecho programas para controlar las bacterias resistentes a los antibióticos como la rotación de antibióticos.<sup>9</sup>

De acuerdo con Howard B. Newcomb y Roma Hawirko<sup>10</sup> las bacterias pueden dar una información importante del proceso de la mutación de los genes. Se han estudiado la resistencia de tres diferentes antibióticos en bacterias: penicilina, sulfato de sodio y estreptomicina. Demerec fue un científico que llevo a cabo proyectos con la estreptomicina, él estaba muy enfocado en la formación y el uso del material genético pero se especificó en las mutaciones. En su trabajo concluyó que los antibióticos se tienen que suministrar inicialmente en dosis muy grandes, para que las bacterias resistentes no se puedan desarrollar. También indico que siempre es bueno combinar diferentes antibióticos ya que si una bacteria es resistente a un antibiótico es muy poco probable que sea resistente al otro.<sup>11</sup>

**Hipótesis:**

La bacteria *Escherichia coli* evoluciona al desarrollar resistencia al antibiótico estreptomycin.

**Objetivos:**

General: Demostrar la existencia de la evolución de manera experimental.

Específico: Demostrar que los mecanismos de la evolución operan en una cepa de *Escherichia coli* en la presencia de estreptomycin por medio de la selección natural.

**Lugar:**

IBT (Instituto de biotecnología) UNAM, Laboratorio del Doctor Lorenzo Segovia

**Materiales:**

- Bacteria *Escherichia coli* JM101- 1 cepa
- Estreptomycin-10 ml
- Medio de cultivo: Luria Broth (extracto de levadura 5 g/L, peptona de caseína 10g/L, y NaCl 10 gr/L) Para preparar el medio solido se agrega agar bacteriologico al 15 %.
- Cajas de Petri
- Palillos esterilizados
- Haza de vidrio

**Equipo:**

- Incubadora con agitacion (Marca Lab-Line Incubator-Shaker) de temperatura controlada
- Micropipetas (Marca Gilson)
- Incubadora estatica de temperatura controlada (marca BG)

**Metodología:**

Nuestro proyecto lo dividimos en cuatro partes principales:

**Estandarización del cultivo inicial**

Realizamos crecimientos de colonias de bacterias *Escherichia coli* JM101 en cajas de Petri con concentraciones distintas del antibiótico estreptomycin y en cajas control sin antibiotico.

1. Se realizaron diluciones seriadas de un cultivo líquido de la bacteria *Escherichia coli* JM101 crecida durante toda la noche. La razón de dilución fue de 1:100 para obtener una solución con una densidad baja de bacterias que se pudieran contar fácilmente en el experimento testigo en cajas de petri con medio Luria sin antibiotico. El cultivo se diluyo 10 veces.(ver foto 1)
2. 100 µl de cada dilución del cultivo fueron sembrados en cajas de Petri con medio de cultivo esteril. Se utilizó un haza de vidrio que fue esterilizada con etanol y flameada antes de utilizar para esparcir el cultivo en toda la caja de Petri.
3. Las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C en una incubadora estatica
4. Al día siguiente se contaron las bacterias que crecieron en cada caja para estimar el número inicial de bacterias en el experimento. Con este dato calculamos cuantas bacterias utilizamos en el inicio del experimento.

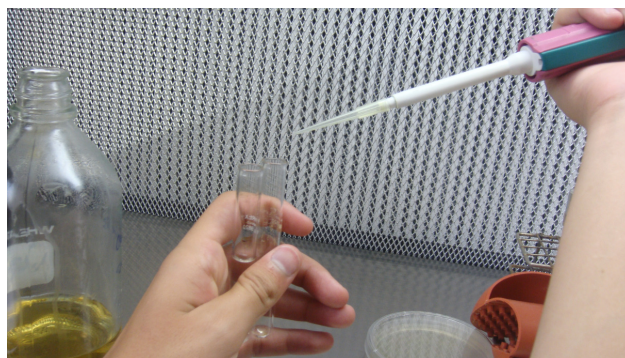
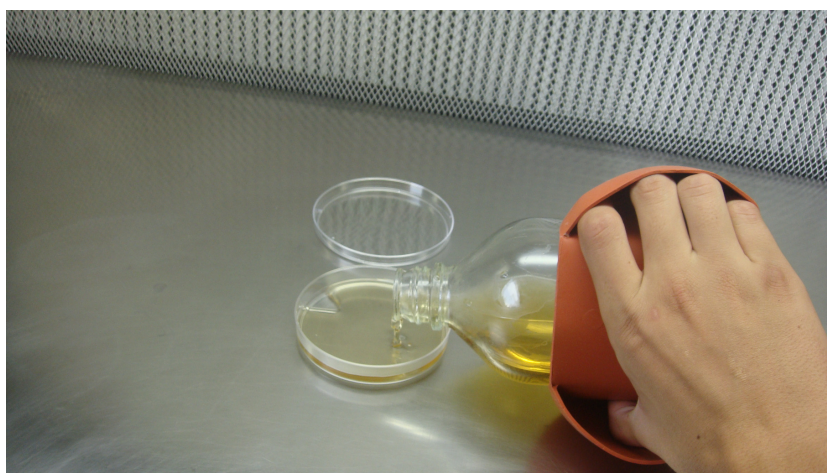


Foto 1

**Análisis de número de bacterias resistentes a Estreptomicina en cajas Petri con diferentes concentraciones del antibiótico**

1. El cultivo inicial ( $10^9$  bacterias) fue sembrado en las cajas Petri que contenía diferentes concentraciones de estreptomicina, 20, 30, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$  en cuadruplicado (una por cada integrante del equipo)
- 2.- Las cajas se incubaron toda la noche en la incubadora a 37 °C.
- 3.- Al día siguiente se contaron las bacterias.



**Análisis de número de bacterias resistentes a Estreptomicina en cajas Petri con gradiente de antibiótico**

1. Se preparo un nuevo cultivo inicial de mayor concentración ( $> 10^{11}$  bacterias) que fue sembrado en unas cajas de Petri con gradiente de 0 a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Para hacer los gradientes diluimos suficiente estreptomicina en el medio de cultivo después de calentarlo para que hubiera una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  final y las pusimos en una pendiente (ver foto 2) y las dejamos solidificar. Después colocamos en posición horizontal y vertimos LB sin antibiótico sobre las cajas con el medio previamente solidificado, esto se hizo para que se nivelara y poder tener el gradiente (ver foto 3). Con este método se obtiene una caja de Petri con una concentración alta de antibiótico (20  $\mu\text{g/ml}$ ) un lado de la caja de Petri y en el lado contrario se tiene la concentración más baja (que tiene a cero antibiótico). En total se hicieron 12 cajas con gradiente (tres por cada participante del equipo)
2. Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C

3. Al día siguiente se contaron las colonias resistentes al antibiótico

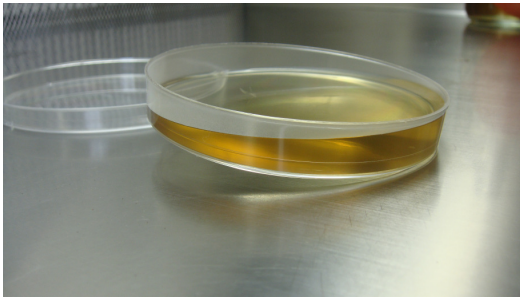


Foto 2

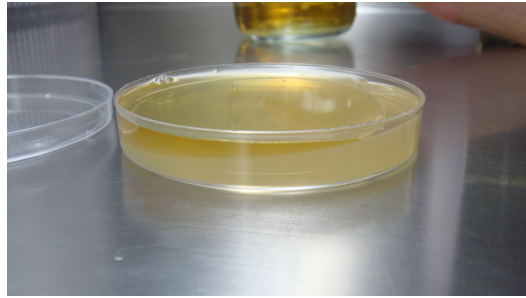
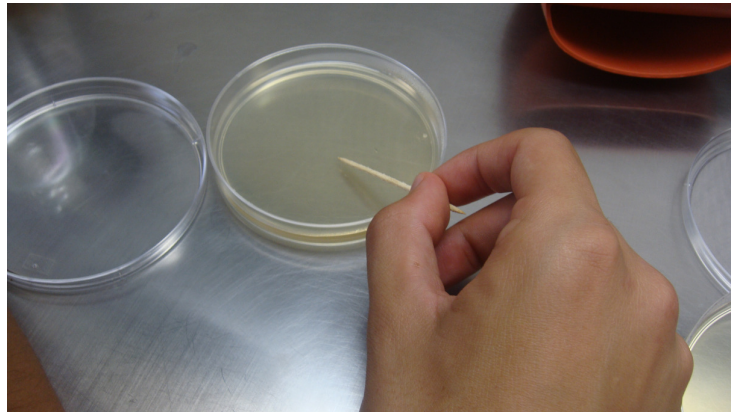


Foto 3

**Análisis de la máxima resistencia alcanzada en las bacterias seleccionadas en cajas de Petri con gradiente**

1. Las colonias que crecieron en las cajas con gradiente fueron transferidas a cajas con concentraciones de 20, 30 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina. Se utilizaron palillos esterilizados para transferir las colonias de los gradientes a las nuevas cajas de Petri.
2. Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C
3. Al día siguiente se contaron las colonias resistentes al antibiótico



**Diseño experimental:**

Variable independiente:

Concentración de estreptomina

Variable dependiente:

Número de colonias sobrevivientes.

Número de experimentos:

- **La estandarización del cultivo inicial** se hizo solo una vez con cada cultivo.

- **El análisis de número de bacterias resistentes a Estreptomina en cajas Petri con diferentes concentraciones de antibiotico** se hizo cuatro veces (es decir una repeticion por cada integrante del equipo.)
- **El análisis de número de bacterias resistentes a Estreptomina en cajas Petri con gradiente de antibiotico** se hizo tres veces por persona.
- **Análisis de la máxima resistencia alcanzada en las bacterias seleccionadas en cajas de Petri con gradiente** se hizo una vez por persona cada concentración.

#### Niveles de las variables a experimentar:

Usamos diferentes concentraciones del antibiótico estreptomina; 10, 20, 30, 40, 50, 100 y 200 µg/ml. También utilizamos cajas con gradientes de 0 a 20 µg/ml. En cada caja sembramos  $1 \times 10^9$  bacterias para las cajas Petri con diferentes concentraciones de estreptomina. Para las cajas de gradiente utilizamos  $10^{11}$  bacterias por caja. Se picaron con palillo aproximadamente 100 colonias resistentes

#### Análisis de los datos:

Analizamos el número de colonias sobrevivientes expuestas a diferentes concentraciones de antibiótico. Presentamos estos datos en una tabla.

#### **Resultados:**

##### **Estandarización del cultivo inicial**

Se realizaron las diluciones descritas en la metodología para obtener el número bacterias en el cultivo inicial. Los datos de las cajas Petri nos indicaron que el número total de bacteria en este cultivo fue de  $10^9$ . Ya que en las primeras diluciones teníamos un tapete de bacterias que era imposible de contar, pero en la dilución  $10^{-8}$  teníamos 10 colonias.

##### **Análisis de número de bacterias resistentes a Estreptomina en cajas Petri con diferentes concentraciones de antibiotico**

Inoculamos cajas petri con concentraciones de 10-200 µg/ml de estreptomina. No se obtuvieron colonias resistentes en ninguna de las cajas por lo que el experimento fue modificado. Este dato significa que la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a estreptomina está entre  $10^9$  y  $10^{11}$ . Por lo tanto decidimos iniciar el experimento con una concentración mayor de bacterias (100 veces mayor, o sea el experimento con gradientes).

##### **Análisis de número de bacterias resistentes a Estreptomina en cajas Petri con gradiente de antibiotico**

Dado el resultado anterior decidimos utilizar un nuevo cultivo con mayor concentración de bacterias ( $10^{11}$  bacterias). Propusimos usar gradientes en las cajas petri para que hubiera más probabilidades que sobrevivieran en concentraciones menores de 20 µg/ml por eso los gradientes fueron hechos de 0 a 20 µg/ml de estreptomina. Se sembraron entonces un aproximado de  $10^{11}$  bacterias por caja. Después de crecer las bacterias en las cajas con gradientes aparecieron algunas

colonias resistentes (aproximadamente 100 colonias). Una vez que obtuvimos colonias resistentes las pasamos a cajas Petri con diferentes concentraciones de estreptomina (de 20 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) con la idea de identificar cual era la concentracion maxima que estas colonias podrian resistir. El analisis de estos datos nos indicó que las bacterias sólo resistieron hasta 30  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina (tabla1). Obtuvimos 60 colonias resistentes a 30  $\mu\text{g.ml}$  pero estas colonias vienen de un cultivo inicial que contenis  $10^{11}$  bacterias.

Este estudio muestra que si es posible seleccionar bacterias que evolucinen hacia resistencia a antibiotico. Fue necesario incrementar el número de bacterias iniciales para incrementar la poblacion y permitir la selección de las bacterias resistentes.

Tabla 1.- numero de bacterias resistentes a antibiotico

Estreptomina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Colonias capaces de crecer
20 $\mu\text{g/ml}$ (media)	100
30 $\mu\text{g/ml}$	60

### Discusión:

Nuestros resultados nos muestran que la tasa de aparición de colonias resistentes es mayor que  $10^9$  dados que no aparecieron absolutamente ninguna colonia cuando iniciamos el experimento con esta concentracion de bacterias. Cómo necesitábamos un número mayor de bacterias para obtener colonias resistentes, incrementamos el número a  $10^{11}$ . También, como no sabíamos que concentración de estreptomina iban a tolerar, hicimos los gradientes de 0 a 20  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina.

Nos aseguramos de que la resistencia que adquirirían las bacterias se mantuviera a través de las generaciones al resemebrarlas en cajas de Petri con la misma concentracion de antibiotico con la que fueron seleccionadas y a una concentración mayor del antibiótico. El que algunas bacterias sobrevivieran a concentraciones mayores del antibiótico nos permitió ver la evolución en acción ya que para que sucediera esto era necesario que cambiara la composición genética de nuestras bacterias por selección de mutaciones espontáneas.

### Conclusiones

Demostramos la evolucion hacia resistencia a antibiotico experimentalmente ya que fuimos capaces de seleccionar algunas bacterias mutantes resistentes al antibiotico. Obtuvimos muy pocas bacterias resistentes ya que la mutacion espontánea tiene una frecuencia muy baja (ya antes mencionada).

Pudimos llevar a acabo la evolución, ya que, si la sepa hubiera tenido un porcentaje de bacterias con resistencia al antibiótico, en nuestro primer experimento el cuál era inocular las bacterias en cajas con diferentes concentraciones de estreptomycin hubieran crecido bacterias, ya que se hubieran reproducido y hubieran originado colonias resistentes.

Como futuro de este proyecto nos interesaria identificar cual es el gen que da la resistencia al antibiotico y realizar la secuencia del mismo en la cepa y la cepa mutante para identificar la mutación que confiere la resistencia a este antibiótico (estreptomycin) .

### **Agradecimientos:**

Queremos agradecer principalmente al Doctor Enrique Galindo, por habernos brindado la oportunidad de hacer este proyecto. Posteriormente también queremos agradecer al Doctor Lorenzo Segovia, que nos asesoro a través de este proyecto, y finalmente al IBT que fue la institución que financio nuestra investigación

### **Bibliografía:**

1. *Encyclopaedia Britannica*. (1991). Chicago: Universidad de Chicago. ISBN:0-85229-529-4. Tomo 18, capítulo: Human Evolution. págs: 805-809.
2. Anónimo (2009) *DNA and Mutations*. [ HYPERLINK "[http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/0\\_0\\_0/mutations\\_01](http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/0_0_0/mutations_01)" [http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/0\\_0\\_0/mutations\\_01](http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/0_0_0/mutations_01) ] Accesada el 17 de febrero del 2009 de Understanding Evolution. "Evolution" es un proyecto colaborativo de la Universidad de California Mueso de Paleontología y el Centro Nacional (EUA) para educación científica.
3. *Salvat Básico*. (1985). Bogotá: Carvajal S.A. ISBN:958-620-008-6. Tomo 5, p.611
4. Anónimo (2008) *Los Plásmidos*. [<http://www.medmol.es/termino.cfm?id=87>] Accesada el 17 de febrero del 2009. "Medmol" es una página de la Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental que publica información sobre la medicina molecular.
5. Martini, M. (2006) *Lamarck y la evolución biológica*. [[http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/recorrido-historico/por-que-los-seres-vivos-son-como-los-conocemos-la-teoria-de-la-evolucion/lamarck\\_y\\_la\\_evolucion\\_biologi.php](http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/recorrido-historico/por-que-los-seres-vivos-son-como-los-conocemos-la-teoria-de-la-evolucion/lamarck_y_la_evolucion_biologi.php)] Accesada el 17 de febrero del 2009. "Educ.ar" es el portal educativo de Argentina que tiene como objetivo ejecutar las políticas del Ministerio de Educación.
6. Darwin, Charles. (1859). El origen de las especies. Barcelona, España. Editorial Planeta-De Agostini. ISBN:84-395-2172-3. Capítulo IV: Selección Natural, o la supervivencia de los más adecuados p.101-102
7. Quammen, D. (Febrero 2009) El bicentenario de Darwin (Primera parte). *National Geographic*. Vol. 24, Núm. 2, págs.16 y 17

8. Bernal, E. ( 6 de diciembre 2007) Resistencia bacteriana: cuando los antibióticos ya no funcionan. *La Voz (Salud.)* [<http://www.azcentral.com/lavoz/salud/articles/120807resistencia-CR.html>] Accesada el 17 de febrero de 2009. "azcentral.com" es una página de "The Arizona Republic" que es un periódico, el cuál es el más visitado en Arizona. Colabora con USA Today. Está en la asociación Metromix, la cuál es un canal de entretenimiento que solo está en ciudades importantes de los EUA.

9. Anónimo (20 de julio del 2004) Estudios de la Universidad de Chile comprueban que bacterias pueden volverse inmunes a los antibióticos en animales. *Universia*. [[http://www.universia.cl/html\\_estatico/portada/actualidad/noticia\\_actualidad/param/noticia/figdi.html](http://www.universia.cl/html_estatico/portada/actualidad/noticia_actualidad/param/noticia/figdi.html)] "Universia" es la red de colaboración universitaria más grande de iberoamérica la cuál integra a mas de 1,100 universidad en 15 países. Las universidades socias de Universia representan al 76 por ciento del colectivo universitario de los países donde está presente.

10. Howard B. Newcomb y Hawirko R. (Febrero 35, 1949) SPONTANEOUS MUTATION TO STREPTOMYCIN RESISTANCE AND DEPENDENCE IN ESCHERICHIA COLI. National Research council. URL (pdf): <http://jb.asm.org/cgi/reprint/57/5/565.pdf>, accesada el 24 de mayo de 2009.

11. Anónimo (2000) Milislav Demerec Papers. American Philosophical Society. URL: <http://www.amphilsoc.org/library/mole/d/demerec.htm>. Accesada el 24 de mayo de 2009. The American Philosophical Society ha jugado un papel importante en la cultura americana y la vida intelectual por más de 250 años.