

# **Título: Interrupción del lenguaje bacteriano como una alternativa a los antibióticos.**

**Autores: Karen Méndez Coronado, Daniela Vázquez Armenta, Marlen Mayorga Flores, Samantha Rupit Arteaga, Ana Laura Salinas Romero.**

**Asesor: Dr. Jorge Membrillo Hernández**  
**Escuela: ENP 1 "Gabino Barreda" UNAM**  
**Categoría: Ciencias Biológicas, experimental.**

## **Antecedentes.**

Uno de los problemas más importantes generado por los tratamientos con antibióticos es la aparición inescapable de cepas microbianas resistentes a los mismos (por medio de la selección natural). Por lo que los médicos deberían tener un control estricto de la prescripción de los antimicrobianos. Sin embargo, en nuestro país no existe un control de venta y distribución de los antibióticos por lo que este problema va más allá del control médico e inclusive la automedicación aumenta éste problema. Desde el punto de vista bacteriano, el problema es muy grave, ya que la selección de bacterias resistentes a múltiples antibióticos es constante dando como resultado el fenómeno llamado multiresistencia.

Las bacterias se agrupan en comunidades sésiles o biocapas a través de una conducta coordinada, es ésta forma la principal fuente de infección en el hombre. Dado que las biocapas les proveen con un escudo físico y las bacterias son tan numerosas y se multiplican rápidamente, algunas bacterias pueden sobrevivir a la acción de prácticamente cualquier medicamento, lo que muchas veces conduce a la muerte del paciente. Los microbios que de por sí tienen una ligera resistencia a los antibióticos logran sobrevivir, se replican y así transmiten sus genes a otras generaciones. Por esa razón se requieren métodos alternativos de combate a las infecciones por microorganismos. En particular, una manera novedosa de atacar a las infecciones sería modificar la conducta de las bacterias y evitar la formación o promover la disgregación de las biocapas bacterianas.

## **Objetivo**

Encontrar en infusiones de plantas, sustancias o compuestos que modifiquen el lenguaje bacteriano y que inhiban la formación de biocapas, sin matar a las bacterias para así evitar su selección.

## **Metodología**

La Metodología empleada constó de los siguientes pasos: **1.** Recolección de plantas. **2.** Obtención de extractos. **3.** Esterilización de extractos. **4.** Obtención de cultivos de una cepa de laboratorio de *Escherichia coli* que puede hacer biocapas en pozos de PVC. **5.** Mezcla de concentraciones crecientes de las infusiones con los cultivos de la cepa de laboratorio e incubación bajo condiciones experimentales controladas. **6.** Preparación de los pozos de PVC para ensayo de biocapas. **7.** Detección de la formación de biocapas. **8.** Cuantificación de la cantidad de biofilm. **9.** Análisis de la toxicidad de las infusiones.

## **Desarrollo**

**1.** Se recolectaron cuarenta y un plantas y flores de diferentes lugares de la región del sur de la Ciudad de México (Milpa Alta, Xochimilco, Tlahuac, Coyoacán). **2.** En una pequeña olla de peltre colocamos 500 ml de agua y una porción de la planta (este experimento se llevo a cabo por separado con cada una de las plantas) dejamos hervir durante 15min, de esta forma se obtuvo las infusiones. La infusión se dejó enfriar para después colocarla en frascos de vidrio. El envase se marcó con el nombre de la planta o la flor. Después se llevaron al laboratorio ya que este procedimiento se realizó en nuestros hogares. Numeramos las infusiones del 1 al 41. **3.** Con la ayuda de pipetas colocamos 5 ml de cada infusión en un tubo de ensayo previamente esterilizados y cubiertos con tapa de metal. Posteriormente los colocamos en un vaso de precipitado de 500 ml y le agregamos alrededor de 250 ml de agua destilada, lo cubrimos con papel aluminio y lo pusimos al fuego (mechero de Bunsen) durante 15 min para la esterilización en el laboratorio de las infusiones. Verificamos la esterilidad de las infusiones inoculando tres cajas de Petri con Agar bacteriológico, marcamos nueve números (por fuera y en la parte inferior de cada caja) para luego colocar una pequeña muestra de cada infusión correspondiente al número marcado. Esto se realizó cerca de un mechero encendido para preservar la esterilización. Posteriormente fueron incubados a 37° C durante 24 hrs. Aquellas infusiones que no presentaron colonias bacterianas en la caja de Petri se utilizaron para estudios posteriores. **4.** Se preparó un cultivo "de toda la noche" de la cepa W3100 (referida en el laboratorio del Dr. Jorge Membrillo Hernández como "Cepa silvestre") en 5 ml de medio LB (1% extracto de levadura, 0.5% peptona caseína, 1% NaCl en H<sub>2</sub>O destilada, con un pH = 8.0) a 37°C con agitación de 200 rpm. **5.** Se utilizaron pozos de PVC de 250 µl para mezclar las infusiones con las bacterias de la cepa W3100. Los pozos fueron primeramente esterilizados en un horno luz UV (crosslinker) a una energía de 700 J/cm<sup>2</sup> durante 2 min, éste proceso lo realizamos dos veces para asegurar la esterilización de los pozos. Posteriormente inoculamos 150 µl del cultivo de W3100 en cada pozo. Se utilizaron 4 concentraciones crecientes de infusión y en cada experimento se

utilizaron 2 experimentos control, a los que no se les adicionó infusión alguna. **6.** Los pozos previamente inoculados y dentro de unos recipientes de plástico fueron incubados en la estufa a 37° C por 48 hrs. **7.** Se lavaron los pozos con agua destilada para remover el medio de cultivo y teñimos los pozos con cristal violeta. Vaciamos un poco de cristal violeta (colorante que tiñe la pared celular bacteriana) y se llenaron los pozos hasta el tope. Se dejaron durante 20 min a temperatura ambiente y después removimos el cristal violeta sobrante de los pozos con una pipeta. Lavamos con H<sub>2</sub>O y los dejamos secar. Las biocapas bacterias fueron evidentes como un anillo en la interfase aire-líquido. **8.** Hicimos una solución que contenía 40 ml de etanol (80%) y 10 ml de acetona (20%). Fue puesta en una cubeta con hielo para mantenerla a 4°C y así evitar su evaporación. Colocamos 200 µl de esta solución en cada pozo. En seguida los trasladamos al cuarto frío donde se dejaron reposar durante 20min. Con esta solución diluimos el colorante que estaba adherido a las paredes de cada pozo, y como el cristal violeta es el indicador de la formación de biocapas removimos a estas. Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro. Este se configuró a 590 nm que es el espectro por donde la luz violeta es absorbida. En las cubetas de este aparato (son unos recipientes cuadrados y transparentes) colocamos 800 µl de H<sub>2</sub>O destilada más 200 µl de la solución existente en cada pozo. Para la cuantificación se metieron todas las soluciones antes hechas de los 8 pozos de cada infusión al mismo tiempo en el espectrofotómetro. Después el aparato nos dio los resultados exactos de concentración de colorante (o sea equivalente a la cuantificación de la cantidad de biocapas bacterianas). Después de la cuantificación de los 8 pozos de una infusión. Lavamos las cubetas con H<sub>2</sub>O destilada y repetimos este proceso con todos los pozos de cada una de las demás infusiones. **9.** Se colocó 1.5 ml de LB en un tubo de 2 ml y con el asa metálica-bacteriológica, se incorporó un poco del cultivo W3110, lo mezclamos en el vórtex aproximadamente 3 min. Hicimos diluciones de éste cultivo con diferentes concentraciones de infusiones para saber qué infusión tenía efecto bactericida y dichas infusiones fueron desechadas..

### **Resultados**

1. Se estudiaron infusiones de 41 plantas de las cuales se desechó una por no pasar la prueba de esterilización.
2. Al mezclar concentraciones crecientes de las infusiones con cultivos de la cepa W3110, la mayoría no tuvieron efecto alguno en la formación de biocapas, algunas de ellas tuvieron un efecto negativo en la producción de biocapas y en algunas inclusive tuvieron un efecto positivo en la cantidad de biocapas formadas..
3. La cuantificación de biocapas nos permitió seleccionar aquellas infusiones que alteraban la formación de biocapas.
4. De las infusiones probadas, sólo una tuvo un efecto bactericida (hierbabuena) lo que explica la baja formación de biocapas.

### **Conclusiones**

1. Se logró identificar infusiones que alteran la formación de biocapas bacterianas.
2. Interrumpir el lenguaje bacteriano si puede ser una alternativa al combate contra las infecciones.
3. A través de nuestra experimentación concluimos que algunas plantas pueden modificar el lenguaje bacteriano, ya que contienen moléculas que tienen efecto bacteriostático despegando o evitando la formación de biocapas y así se evita la creación de una presión selectiva en las bacterias ofreciendo una alternativa eficaz a los antibióticos.
4. Ahora falta la identificación de las moléculas responsables de los efectos observados.

### **Bibliografía**

Bergoglio, Remo. Antibióticos. Argentina, 1993, Ed. Médica Panamericana. Ed. Sa. Pp 18-21.

Brock, Thomas. Madigan, Michael. Microbiología. Pentrice Hall. Sexta edición. México, 2004.

Braude, A. I. Enfermedades infecciosas. Ed. Méd. Panamericana. Buenos Aires, 1984.

Colón González, Maritrini. El papel del oxígeno en la formación de biofilms en Escherichia coli. UNAM, México, 2003.

Drobnic, Ludvik. Tratamiento antimicrobiano. Ergon. Tercera edición. México, 2002. pp 792.

Hardman, Limbird, Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill. Décima edición. Volumen II. México, 2003.

Martínez Romero, Esperanza y Silva Sánchez, Jesús. Batallas microscópicas, en: Cómo ves? #66, año 6. UNAM. Pp. 16-19.

