

## DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

# EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL GENERO *BACILLUS* FRENTE A ANTIBIOTICOS

M. Jiménez-Valera; A. Ruiz-Bravo y A. Ramos-Cormenzana

### RESUMEN

Se ha estudiado la susceptibilidad de 54 cepas de *Bacillus*, incluidas en 23 especies, frente a 17 antibióticos pertenecientes a diversos grupos, mediante la técnica clásica de antibiograma por difusión en agar, incubando las placas a 37°C y a 22°C respectivamente. En el 86 % de los casos estudiados, la susceptibilidad fue mayor a 22°C que a 37°C, y solamente en el 1 % ocurrió lo contrario. La influencia de la temperatura fue similar sobre cepas mesófilas, psicrófilas y termófilas.

### SUMMARY

The classical agar diffusion method was applied to study the sensitivity of 54 strains included in 23 species of genus *Bacillus*, against 17 antibiotics different groups. Sensitivity test were belonging to performed at 22°C and at 37°C. Bacterial sensitivity at 22°C was larger than at 37°C in most of the cases (86 %), whereas the contrary was infrequent (1 %). Sensitivity of mesophile, thermophile, and psychophile strains were equally influenced.

### INTRODUCCION

La temperatura es uno de los factores físicos ambientales que ejercen una influencia decisiva sobre el crecimiento bacteriano (1). El efecto de la temperatura sobre el tiempo de generación de los microorganismos ha sido extensamente estudiado; ya es clásica en microbiología la agrupación de las bacterias en psicrófilas, mesófilas y termófilas, de acuerdo con sus rangos de temperatura para un crecimiento óptimo (2). La temperatura influye no sólo en la velocidad de crecimiento, sino también en la composición de algunas estructuras celulares. Uno de los ejemplos mejor conocidos de esta influencia es el de los cambios en la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados en la membrana citoplasmática de bacterias mesófilas como *Escherichia coli*, dependiendo de la temperatura de crecimiento (3). Recientemente se ha comunicado que la expresión de proteínas de la membrana externa de *Yersinia enterocolitica* es termodependiente (4).

La susceptibilidad bacteriana frente a los agentes antimicrobianos viene determinada por mecanismos complejos, entre los que cabe señalar algunos que a su vez pueden resultar notablemente influenciados por la temperatura: Tales serían la permeabilidad de las cubiertas celulares, la expresión de enzimas inactivantes, la expresión de proteínas con afinidad para antibióticos, etc. Por tanto, la temperatura de crecimiento puede influir de forma importante en la sensibilidad a antibióticos, como ha sido demostrado para *Y. enterocolitica* en nuestro Laboratorio (5).

En el presente trabajo pretendemos extender el estudio de la influencia de la temperatura en la susceptibilidad frente a antibióticos a especies del género *Bacillus*, incluyendo cepas mesófilas, termófilas y psicrófilas.

## MATERIAL Y METODOS

### *Bacterias*

Las cepas incluidas en este estudio, su procedencia y las especies a que pertenecen se muestran en la Tabla I.

### *Antibióticos*

Se utilizaron discos comerciales de antibiograma, cuyo origen y concentración se relacionan en la Tabla II.

### *Preparación de inóculos*

Las cepas se cultivaron en tubos con Trypticase soy agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) inclinado, para obtención de masa bacteriana, incubándose a 37°C durante 18 h. Las bacterias se recogieron en solución salina al 0,85 %, ajustándose la concentración por nefelometría hasta un valor equivalente al estandar de BaSO<sub>4</sub> propuesto por Bauer y col. en 1974 (6).

### *Susceptibilidad frente a antibióticos*

Los inóculos se diseminaron en la superficie de placas de Müller-Hinton (Institut Pasteur Production, París), siguiendo la técnica clásica de antibiograma en medio sólido (7). Una vez colocados los discos, las placas se mantuvieron 15 minutos a 4°C para la predifusión de los antibióticos (8) tras lo cual se incubaron a 22°C o a 37°C durante 24 h, procediéndose entonces a medir los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento sobre fondo oscuro y con luz lateral.

Tabla I. Cepas de Bacillus.

Especie	Cepa <sup>a</sup>	Especie	Cepa
<u>B. alvei</u>	ATCC 6344	<u>B. macerans</u>	CCM 2012
	CCM 2051	<u>B. megaterium</u>	ATCC 25848
	PCM 481		CCM 2007
<u>B. aminovorans</u>	ATCC 7046		PCM 1855
<u>B. badius</u>	ATCC 14574	<u>B. mycoides</u>	PCM 1401
	CCM 2113	<u>B. pantothenicus</u>	ATCC 14576
<u>B. brevis</u>	ATCC 8246		CCM 2049
	CCM 2050		PCM 454
<u>B. cereus</u>	ATCC 11778	<u>B. polymyxa</u>	ATCC 842
	ATCC 14579		CCM 459
	CCM 1992		FG 29
	PCM 482		PCM 451
<u>B. circulans</u>	ATCC 4513	<u>B. psychrophilus</u>	PCM 1850
	ATCC 9966	<u>B. pulvifaciens</u>	CCM 39
	CCM 2048	<u>B. pumilus</u>	ATCC 7061
	PCM 1398		ATCC 14884
<u>B. coagulans</u>	ATCC 7050		CCM 2144
	ATCC 10545		PCM 1852
	PCM 1843	<u>B. sphaericus</u>	ATCC 14577
<u>B. firmus</u>	CCM 2213		CCM 2120
<u>B. laterosporus</u>	CCM 2116		PCM 485
<u>B. lentus</u>	ATCC 10840	<u>B. stearothermophilus</u>	FG 47
	CCM 2014		PCM 453
	PCM 450	<u>B. subtilis</u>	ATCC 6051
<u>B. licheniformis</u>	ATCC 14580		CCM 2216
	PCM 1847		PCM 1903
<u>B. macerans</u>	ATCC 8244	<u>B. thuringiensis</u>	FG 45

<sup>a</sup> ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo; CCM, Colección Checoslovaca de Microorganismos; FG, Colección Facultad de Farmacia de Granada; PCM, Colección Polaca de Microorganismos.

Tabla II. Discos comerciales de antibióticos.

Antibiótico	Procedencia	Concentración
Penicilina G (P)	B-D.Merieux	10 U
Ampicilina (AM)	B-D.Merieux	10 µg
Carbenicilina (CB)	B-D.Merieux	100 µg
Cefaloridina (CD)	B-D.Merieux	30 µg
Cefazolina (CZ)	B-D.Merieux	30 µg
Cloranfenicol (C)	B-D.Merieux	30 µg
Tetraciclina (TE)	B-D.Merieux	30 µg
Bacitracina (B)	B-D.Merieux	10 µg
Eritromicina (E)	B-D.Merieux	15 µg
Amicacina (AN)	BBL	30 µg
Estreptomina (S)	Difco	10 µg
Gentamicina (GM)	B-D.Merieux	30 µg
Kanamicina (K)	B-D.Merieux	30 µg
Tobramicina (TM)	Difco	10 µg
Rifampicina (RA)	B-D.Merieux	30 µg
Acido Fusídico (FA)	B-D.Merieux	10 µg
Novobiocina (NB)	Difco	30 µg

## RESULTADOS

En la Tabla III se resumen las comparaciones de sensibilidad a 22°C y a 37°C para cada una de las 23 especies estudiadas. Cuando se estudiaron varias cepas de una misma especie la comparación se realizó entre las medias aritméticas. De un total de 391 pares especie/antibiótico comparados, en 337 (86 %) la sensibilidad fue mayor a 22°C; en 50 (13 %), no hubo diferencias apreciables entre ambas temperaturas, y sólo en 4 (1 %) la sensibilidad fue ligeramente mayor a 37°C.

Dos antibióticos, bacitracina y estreptomina, destacaron por su relativa indiferencia a los efectos de la temperatura.

Por el contrario, el comportamiento de *B. circulans* frente a los  $\beta$ -lactámicos resultó engañoso, ya que una de las cuatro cepas ensayadas mostró variaciones importantes y en sentido opuesto a las observadas en las otras tres (Tabla IV). Salvo esta única excepción, en las otras especies que agrupaban más de una cepa la influencia de la temperatura fue homogénea, aún en el caso de que algunas cepas fueran más sensibles que otras; un ejemplo típico se expone en la Tabla V. Finalmente, señalaremos que la influencia de la temperatura en las sensibilidades de *B. psychrophilus* y *B. stearothermophilus* frente a los antibióticos estudiados fue similar para ambas especies.

Tabla III. Influencia de la temperatura en la susceptibilidad del género Bacillus a antibióticos.

Especie	Antibióticos																
	P	AM	CB	CD	CZ	C	TE	B	E	AN	S	GM	K	TM	RA	PA	NB
<u>B. alvei</u>	22 <sup>a</sup>	22	22	37 <sup>b</sup>	22	22	22	0 <sup>c</sup>	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. aminovorans</u>	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	37	22	22	22	22	22	22
<u>B. badius</u>	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	22	22	22
<u>B. brevis</u>	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<u>B. cereus</u>	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. circulans</u>	0	0	0	0	0	22	22	0	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. coagulans</u>	22	22	22	22	22	0	22	0	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. firmus</u>	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. laterosporus</u>	0	22	22	22	22	22	22	37	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<u>B. lentus</u>	22	22	22	22	22	0	22	22	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. licheniformis</u>	0	22	0	22	22	0	22	22	22	22	22	22	22	22	22	0	22
<u>B. macerans</u>	22	0	22	22	22	22	0	0	22	22	0	22	22	22	22	0	22
<u>B. megaterium</u>	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. mycoides</u>	22	22	22	0	22	22	22	0	22	22	22	22	22	22	22	22	0
<u>B. pantothenicus</u>	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	0	22	22	22
<u>B. polymyxa</u>	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<u>B. psychrophilus</u>	0	22	22	37	22	22	22	0	22	22	0	22	22	22	22	22	22
<u>B. pulvifaciens</u>	22	22	22	22	0	22	0	0	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<u>B. pumilus</u>	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<u>B. sphaericus</u>	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	0	22	0	22	22	22	22
<u>B. stearothermophilus</u>	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<u>B. subtilis</u>	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<u>B. thuringiensis</u>	22	22	22	22	22	22	22	0	22	22	0	22	22	22	22	0	22

<sup>a</sup> Susceptibilidad mayor a 22°C.

<sup>b</sup> Susceptibilidad mayor a 37°C.

<sup>c</sup> Susceptibilidad indiferente a la temperatura.

Tabla IV. Sensibilidad de cepas de B. circulans frente a  $\beta$ -lactámicos.

Cepas	Temperatura (°C)	P	AM	CB	CD	CZ
ATCC 4513	22	20,5 <sup>a</sup>	29	19	22	17,5
	37	40	44	47	42	42
ATCC 9966	22	39,5	37	55	41	34
	37	31,5	30,5	40	35	32,5
CCM 2048	22	33	42	45	45	44
	37	26,5	33	35,5	39	32
PCM 1398	22	15	17	30	25,5	29
	37	11	19	19,5	22	21,5

<sup>a</sup> Diámetro del halo de inhibición (mm).

Tabla V. Sensibilidad de tres cepas de B. coagulans frente a  $\beta$ -lactámicos.

Cepas	Temperatura (°C)	P	AM	CB	CD	CZ
ATCC 7050	22	41 <sup>a</sup>	41	50	50	37
	37	29,2	31	37,5	34	33,7
ATCC 10545	22	42	41	48	52	45
	37	31	30,5	41	34	35
PCM 1843	22	19	22	27	15,5	25
	37	17	21	25	14,5	17,5

<sup>a</sup> Diámetro del halo de inhibición (mm).

## DISCUSION

Los resultados de nuestro estudio resaltan la influencia de la temperatura de incubación en la susceptibilidad del género *Bacillus* a los antibióticos. Puede generalizarse que la sensibilidad frente a antibióticos de diferentes grupos farmacológicos y con distintos mecanismos de acción, es mayor a 22°C que a 37°C. Resulta aventurado buscar hipótesis que expliquen este hecho. Podría pensarse que, al tratarse

de especies en su mayoría mesófilas, el crecimiento más lento a temperaturas claramente inferiores al óptimo se asocia con un incremento de susceptibilidad. No obstante, dos hechos debilitan esta hipótesis. En efecto, la cepa psicrófila de *B. psychrophilus* está más alejada de su óptimo a 37°C que a 22°C; sin embargo, la influencia de la temperatura en la susceptibilidad de esta cepa es esencialmente idéntica a la registrada en otras especies. Otro tanto ocurre con la cepa de *B. stearrowthermophilus*, siendo así que en ella el crecimiento muy lento a 22°C debería exaltar las diferencias de susceptibilidad.

En la bibliografía no existen precedentes que permitan establecer paralelos con nuestros resultados. Un estudio sobre 13 cepas de la especie mesófila *Y. enterocolitica*, realizado en nuestro Laboratorio, demostró en general mayor sensibilidad a 22°C que a 37°C frente a antibióticos como gentamicina, kanamicina y rifampicina; sin embargo, la presencia de  $\beta$ -lactamasas cuya actividad es mucho mayor a 22°C invierte la situación en lo que se refiere a los  $\beta$ -lactámicos (5).

#### BIBLIOGRAFIA

1. COSTILOW, R.N. En Gerhardt, P. (Ed.), Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington (1981), p. 66-78.
2. STANIER, R., DOUDOROFF, M., y ADELBERG, E. A. Microbiología. Aguilar, Madrid (1977), p. 337-340.
3. MARR, A.G., e INGRAHAM, J.L.J. Bacteriol. 84: 1260-1267 (1962).
4. MARTINEZ, R. Infect. Immun. 41: 921-930 (1983).
5. KOUWATLI, K., BEJAR, V., RUIZ-BRAVO, A., y RAMOS-CORMENZANA, A. Microbios Letters 11: 137-142 (1979).
6. BAUER, J.D., ACKERMANN, D.G., y TORO, G. Clinical laboratory methods. C.V. Mosby Company, Saint Louis (1974), p. 658.
7. BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., y TURCK, M. Am. J. Clin. Path. 45: 493-496 (1966).
8. BOURGEOIS, L.D., HART, L.J., HERMAN, L.G., SCHNEIDERMAN, M. A., y YOUNG, V.M. Antimicrob. Agents Chemother. 283-288 (1966).