

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

POSIBLE INTERES TAXONOMICO DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD FRENTE A ANTIBIOTICOS EN EL GENERO *BACILLUS*

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

RESUMEN

El estudio de la susceptibilidad frente a antibióticos se ha considerado útil en la caracterización taxonómica de algunas especies del género *Bacillus*. La sensibilidad a la rifampicina puede proponerse como prueba de interés, pues diferencia dos grandes grupos de especies según el grado de inhibición mostrado. Otros antibióticos de utilidad en la diferenciación de especies fueron: cloranfenicol, tetraciclina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, ácido fusídico y novobiocina. En general, los β -lactámicos no resultaron apropiados para la identificación, por la irregular distribución de resistencias intraespecíficas. La especie *B. psychrophilus* exhibió un comportamiento diferenciado del de otras especies frente a la mayoría de los antibióticos probados.

SUMMARY

The study of bacterial sensitivity to antibiotics has been found useful to taxonomic characterization of species of the genus *Bacillus*. Sensitivity to rifampicin is proposed as an interesting test, since it characterized two groups of species. Chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, gentamicin, kanamycin, fusidic acid, and novobiocin were also considered useful to the species identification. On the other hand, β -lactam antibiotics were not appropriated for this aim, because of the unpredictable appearance of intraspecific resistances. A characteristic pattern of sensitivity to most antibiotics was shown by *B. psychrophilus*.

INTRODUCCION

Las diferencias de susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos constituyen un criterio frecuentemente aplicado en taxonomía bacteriana. Así, las especies de *Azotobacter* pueden diferenciarse de acuerdo con su sensibilidad frente a colorantes (1); el biotipo el Tor de *Vibrio cholerae* se caracteriza por su resistencia a la

polimixina B (2); *Streptococcus pneumoniae* se distingue de otros estreptococos por su sensibilidad a la optoquina (3) (4).

Con ocasión de un estudio sobre la influencia de la temperatura en la susceptibilidad del género *Bacillus* frente a antibióticos (5) hemos investigado los espectros de sensibilidad de 54 cepas pertenecientes a 23 especies de este género, frente a 17 antibióticos. En el presente trabajo pretendemos valorar las posibles aplicaciones del estudio de sensibilidades frente a antibióticos a la taxonomía e identificación de especies del género *Bacillus*.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias

Se estudiaron 54 cepas cuyo origen y especies a que pertenecen se indican en la Tabla I.

Antibióticos

Se usaron discos comerciales, cuyas características figuran en la Tabla II.

Preparación de inóculos y pruebas de sensibilidad

Se siguió la técnica clásica de antibiograma por difusión en agar Müeller-Hinton (Pasteur Institut Production, Paris), según Bauer y col. (6) incubándose las placas a 37°C y a 22°C; la preparación de inóculos se ha descrito previamente (5).

RESULTADOS

En líneas generales, existió notable homogeneidad en los resultados obtenidos, lo que resalta el posible valor taxonómico de algunas diferencias observadas entre especies. En la Tabla III se comparan las sensibilidades de *B. psychrophilus* frente a varios antibióticos con las del resto de especies estudiadas. El comportamiento de *B. psychrophilus* se diferenció netamente, mostrándose menos sensible que las otras cepas a los antibióticos penicilina, ampicilina, cefaloridina, cefazolina, tetraciclina, estreptomycin, kanamicina y tobramicina; lo contrario ocurrió frente a la novobiocina. Los otros antibióticos probados no aportaron diferencias notables (datos omitidos).

Ninguna otra de las especies estudiadas se diferenció con un número tan considerable de antibióticos. Sin embargo, sí se observaron algunas discrepancias interesantes. La rifampicina fue en este sentido el antibiótico más útil: Como se muestra en la Fig. I permitió diferenciar dos grupos de especies; la frontera entre ambos se fijó, buscando una distribución simétrica, en la sensibilidad que determina un diámetro de 40 mm. Según esto, las especies menos sensibles a la rifampicina fue-

Tabla I. Cepas de Bacillus.

| Especie | Cepa ^a | 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 | |

^a 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 |

Tabla III. Diferenciación de B. psychrophilus respecto de otras especies de Bacillus por su espectro de susceptibilidad frente a antibióticos, a 22°C.

| Antibióticos | Diámetro de inhibición (mm) | |
|--------------|-----------------------------|------------------------------|
| | <u>B. psychrophilus</u> | Resto de especies estudiadas |
| Penicilina | 14,5 | 36 ± 7,9 ^a |
| Ampicilina | 24 | 37 ± 6,3 |
| Cefaloridina | 7 | 41 ± 8,2 |
| Cefazolina | 26,5 | 40,5 ± 6,5 |
| Tetraciclina | 25,5 | 33 ± 5,2 |
| Estreptomina | 7 | 24,5 ± 2,7 |
| Kanamicina | 17,5 | 37 ± 3,5 |
| Tobramicina | 22 | 34 ± 4,3 |
| Novobiocina | 41,5 | 30,5 ± 3,2 |

^a Media aritmética ± desviación estandar.

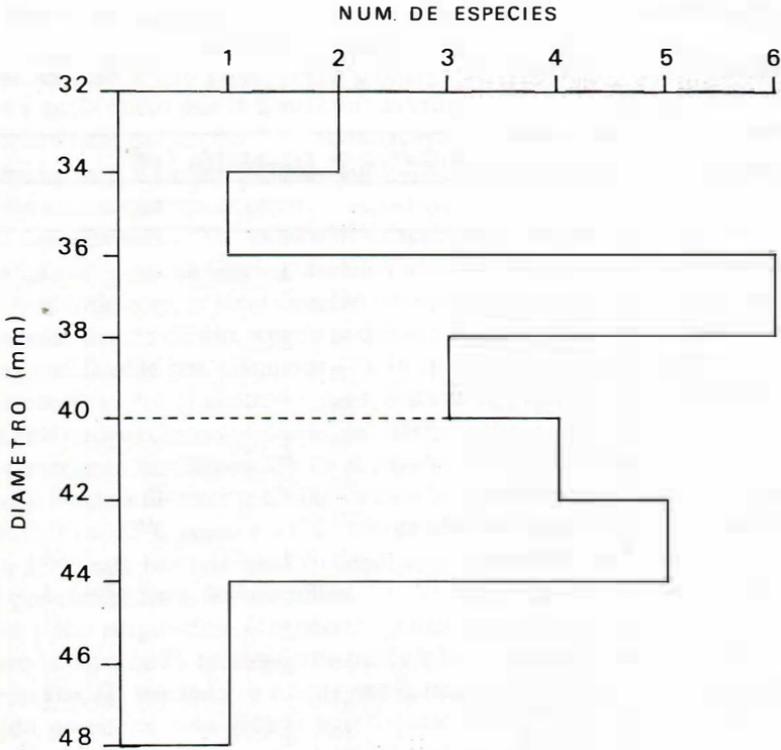


Fig. 1. Histograma agrupando en clases de frecuencia los diámetros de inhibición del crecimiento de 23 especies de Bacillus frente a rifampicina a 22°C.

ron: *B. alvei*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pantothenicus*, *B. polymyxa* y *B. psychrophilus*; y las más sensibles, *B. aminovorans*, *B. badius*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. pulvifaciens*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. Los antibióticos cloranfenicol, tetraciclina, estreptomina, gentamicina, kanamicina y novobiocina permitieron diferenciar algunas otras especies por sus susceptibilidades anómalas (Tabla IV). De esta Tabla se ha excluido la especie *B. psychrophilus*, ya comentada; también se han omitido los β -lactámicos, por haberse observado notables dispersiones en los resultados correspondientes a especies representadas por más de una cepa. Se observa que las especies *B. badius*, *B. aminovorans*, *B. mycoides* y *B. subtilis* se diferenciaron al menos por tres antibióticos; de ellas *B. badius* y *B. subtilis* fueron además las dos especies más sensibles a la rifampicina.

Tabla IV. Diferenciación de algunas especies de Bacillus por sus susceptibilidades a 22°C frente a antibióticos distintos de la rifampicina y los β -lactámicos.

| Antibióticos | Diámetro de inhibición (mm) | | |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | Especies diferenciadas | | Resto de especies ^a |
| Cloranfenicol | <u>B. badius</u> | 45,5 \pm 2,1 ^b | 30,5 \pm 3,5 |
| Tetraciclina | <u>B. aminovorans</u> | 42,5 | 33 \pm 2,6 |
| | <u>B. coagulans</u> | 40 \pm 2 | |
| | <u>B. laterosporus</u> | 24,5 | |
| | <u>B. macerans</u> | 25 | |
| | <u>B. megaterium</u> | 40 \pm 6,9 | |
| | <u>B. mycoides</u> | 40 | |
| | <u>B. pulvifaciens</u> | 25 | |
| | <u>B. subtilis</u> | 25,5 \pm 1,5 | |
| Estreptomycin | <u>B. aminovorans</u> | 19,5 | 25,5 \pm 1,6 |
| | <u>B. sphaericus</u> | 19,5 \pm 11,6 | |
| | <u>B. subtilis</u> | 18 \pm 5,5 | |
| Gentamicina | <u>B. aminovorans</u> | 44 | 35,5 \pm 2,5 |
| | <u>B. badius</u> | 40 \pm 0,7 | |
| | <u>B. cereus</u> | 29 \pm 10,9 | |
| | <u>B. licheniformis</u> | 41,5 \pm 0,7 | |
| | <u>B. macerans</u> | 41,5 \pm 9,2 | |
| | <u>B. mycoides</u> | 40 | |
| | <u>B. pumilus</u> | 42 \pm 5 | |
| | <u>B. subtilis</u> | 42 \pm 0,9 | |
| Kanamicina | <u>B. badius</u> | 42 \pm 0,2 | 36 \pm 2,8 |
| | <u>B. subtilis</u> | 45 \pm 2,3 | |
| Acido fusídico | <u>B. stearothermophilus</u> | 19 \pm 9,5 | 31 \pm 3,4 |
| | <u>B. licheniformis</u> | 13 \pm 1,4 | |
| Novobiocina | <u>B. mycoides</u> | 22 | 31 \pm 2,6 |

^a Excluidos B. psychrophilus y en cada caso las especies diferenciadas por el antibiótico en cuestión.

^b Media aritmética \pm desviación estandar.

DISCUSION

Los resultados que presentamos indican que el estudio de la susceptibilidad frente a antibióticos puede constituir un criterio útil en la diferenciación de algunas especies del género *Bacillus*. Se trata, evidentemente, de un trabajo previo; las observaciones que hemos recogido aquí deberán confirmarse ampliando este estudio a un mayor número de cepas.

La aparentemente fácil expresión de resistencias frente a antibióticos β -lactámicos ha sido causa de heterogeneidades intraespecíficas que limitan la utilidad de estos antibióticos en la identificación de especies. Es posible que estas resistencias inesperadas dentro de una especie se deban a enzimas inactivantes (tal vez β -lactamasas) codificadas por plásmidos (7), lo que explicaría su irregular distribución intraespecífica. Por el contrario, cabe destacar la utilidad de la rifampicina, y de otros antibióticos como la tetraciclina, estreptomycinina y gentamicina.

La excelente caracterización de *B. psychrophilus* se ha basado en su escasa sensibilidad frente a diversos antibióticos (con la importante excepción de la novobiocina), tanto a 22°C como a 37°C; ello es sorprendente, sobre todo considerando que a 37°C esta bacteria crece en condiciones alejadas de su óptimo de crecimiento, y por consiguiente

Un poco sorprendente, a nuestro juicio, resultó la notable sensibilidad que mostró la cepa de *B. thuringiensis* frente a los β -lactámicos, concretamente ante la penicilina G, teniendo en cuenta que la resistencia de esta especie a la penicilina ha sido propuesta para aislarla selectivamente (8). Cabe pensar que la conservación de cepas de colección no siempre mantiene sus características de forma idónea. Como curiosidad, señalaremos que, en líneas generales, las cepas provenientes de la PCM fueron las más resistentes a los β -lactámicos dentro de sus respectivas especies.

BIBLIOGRAFIA

1. CALLAO, V. y MONTOYA, E.J. — Gen. Microbiol. 22: 657 - 661 (1960).
2. WACHSMUTH, I.K.; MORRIS, G.K. y FEELEY, J.C. — En E. H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., y J.P. Truant (ed.), Manual of clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington (1980), p. 226 - 234.
3. LUND, E. — Acta Pathol. Microbiol. Scand. 47: 308 - 315 (1959).
4. FACKLAM, R.R. En E. H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler Jr., y J.P. Truant (ed), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington (1980). p. 88 - 110.
5. JIMENEZ-VALERA, M.; RUIZ-BRAVO, A. y RAMOS-CORMENZANA, A. — Ars Pharmaceutica (1985).
6. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C. y TURCK, M. — Am. J. Clin. Path. 45: 439 - 496 (1966).
7. OGAWARA, H. — Microbiol. Rev. 45: 591 - 619 (1981).
8. KRIEG, A. En M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, y H.G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. Springer-Verlag, Berlín (1981), p. 1453 - 1743.