

Resistencia a antibióticos y actividad antimicrobiana de aislados bacterianos de suelo antártico

NANCY CALISTO¹, LAURA NAVARRO², PAZ ORELLANA², GUILLERMO WIESE, CLAUDIO GÓMEZ, LORENA SALAZAR, PIEDAD CORTÉS-CORTÉS, ANA GUTIÉRREZ-MORAGA, MANUEL GIDEKEL & GINO CORSINI³

1. <https://orcid.org/0000-0002-5517-1750>, ✉ nancy.calisto@umag.cl

2. <https://orcid.org/0000-0001-6962-866>

3. <https://orcid.org/0000-0002-0418-8616>

OPEN ACCESS

Recibido:

01/12/2021

Revisado:

20/12/2021

Aceptado:

22/12/2021

Publicado en línea:

31/12/2021

Editor:

Dr. Américo Montiel San Martín.

ISSN 0718-686XX



RESUMEN

En este estudio 50 aislados bacterianos obtenidos de muestras de suelo antártico prístino, de las islas Rey George y Greenwich (Islas Shetland del Sur), y 25 aislados bacterianos de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv, se estudiaron para determinar si presentan actividad antimicrobiana y para determinar su respuesta a 21 antibióticos. La susceptibilidad a los antibióticos se evaluó siguiendo el método de difusión en disco utilizando diferentes grupos de antibióticos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglicósidos, quinolonas, tetraciclina, fenicoles, macrólidos, sulfonamidas y trimetoprim. La producción de compuestos antimicrobianos por los aislados bacterianos antárticos se determinó mediante el método de difusión en agar, utilizando como indicadores un panel de bacterias patógenas humanas Gram positivo y Gram negativo.

Los aislados bacterianos estudiados mostraron resistencia a 14 (67%) de los 21 antibióticos probados. Tres aislados bacterianos (4%) fueron resistentes a al menos un antibiótico y 47 (63%) fueron multirresistentes. Además, 26 aislados bacterianos (35%) no muestran actividad antimicrobiana y fueron susceptibles a todos los antibióticos estudiados. Finalmente, 27 aislados bacterianos (36%) combinaron actividad antimicrobiana y resistencia múltiple a antibióticos y en promedio presentaron resistencia a 10 antibióticos.

Los aislados bacterianos que combinan actividad antimicrobiana y resistencia múltiple a los antibióticos son especialmente interesantes ya que es probable que estas dos capacidades proporcionen una ventaja competitiva a las bacterias antárticas para permitirles sobrevivir en un entorno hostil. Adicionalmente, estos aislados bacterianos son nuevas fuentes potenciales de compuestos activos para el control de microorganismos patógenos.

Palabras clave: antimicrobianos, multirresistencia a antibióticos, islas Shetland del Sur

Resistance to antibiotics and antimicrobial activity of bacterial isolates from antarctic soil

CÓMO CITAR:

Calisto *et al.* (2021).

Resistencia a antibióticos y actividad antimicrobiana de aislados bacterianos de suelo antártico.

Anales Instituto de la Patagonia,
<https://doi.org/10.22352/AIP202149018>

Contribución de los autores:

NC y CG: Recolección de muestras de las islas Greenwich y Rey Jorge

MG y AG: Recolección de muestras de rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

NC y GC: Redacción general del manuscrito, análisis de la información.

NC, LN, GW: diseño y desarrollo de experimentos microbiológicos

NC, LN, PO, GW, LS: Revisión bibliográfica

Declaración de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiamiento:

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos DIUA189-2020 y DIUA181-2020 de la Universidad Autónoma de Chile. Las muestras fueron recolectadas en el marco del proyecto INACH MA-01-12

ABSTRACT

In this study, 50 bacterial isolates from pristine Antarctic soil samples from King George and Greenwich Islands (South Shetland Islands) and 25 bacterial isolates from the rhizosphere of *Deschampsia antarctica* Desv, were characterized for their antimicrobial activity and response to 21 antibiotics.

Antibiotic susceptibility was assayed following the disc diffusion method using different groups of antibiotics: penicillins, cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides, quinolones, tetracycline, phenicols, macrolides, sulfonamides, and trimethoprim. Antimicrobial compounds production by the Antarctic bacterial isolates were determined using the agar diffusion method, using a set of human pathogenic bacteria.

The bacterial isolates studied showed resistance to 14 (67%) out of the 21 antibiotics tested. Three bacterial isolates (4%) were resistant to at least one antibiotic and 47 (63%) were multidrug-resistant. Additionally, 26 (35%) bacterial isolates do not show antimicrobial activity and were susceptible to all antibiotics studied. Finally, 27 (36%) bacterial isolates combining antimicrobial activity and multiple resistance to antibiotics. These bacterial isolates on average presented resistance to 10 antibiotics. The bacterial isolates combining antimicrobial activity and multiple resistance to antibiotics are especially interesting. These two capabilities probably provide a competitive advantage to Antarctic bacteria to enable them to survive in a harsh environment. These microbial isolates are potential new sources of active compounds for the control of pathogenic microorganisms.

Keywords: antimicrobials, multidrug resistance, South Shetland Islands

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del suelo producen una amplia gama de metabolitos secundarios, este tipo de compuestos se utilizan, principalmente, en la comunicación, la competencia con otros organismos y para adaptarse a los cambios ambientales (Zhu *et al.* 2019).

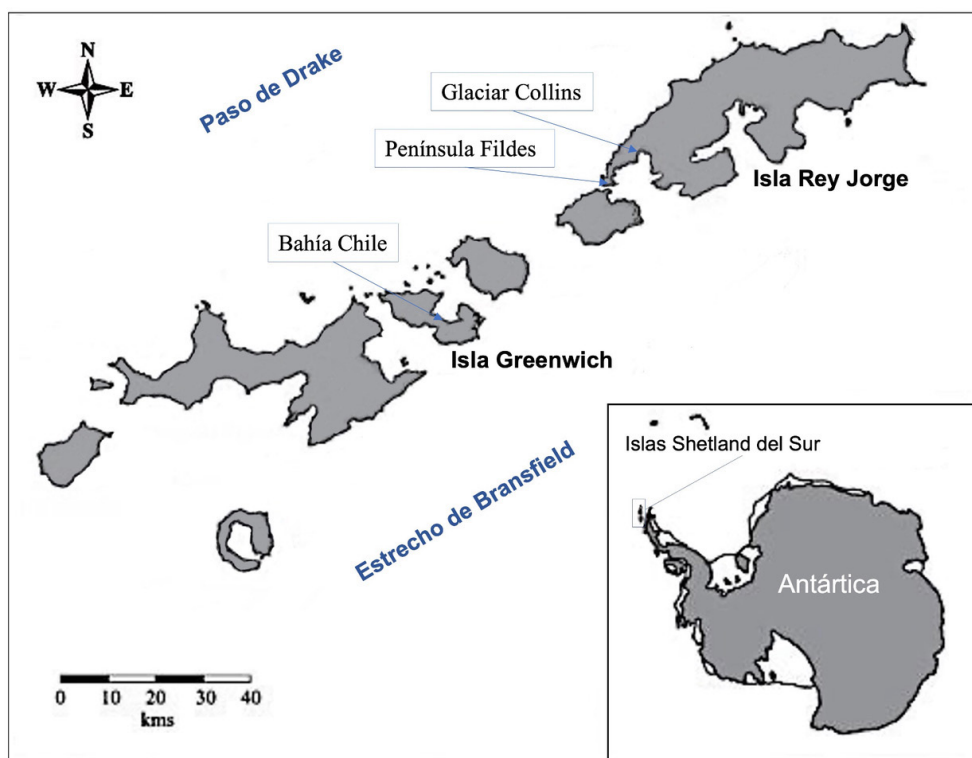
Para obtener una ventaja competitiva, algunos microorganismos son capaces de producir compuestos antimicrobianos para inhibir el crecimiento de sus competidores (Tomova *et al.* 2015). Adicionalmente, los microorganismos productores de antimicrobianos pueden poseer mecanismos de autoprotección, resistencia antimicrobiana, que les permiten defenderse eficazmente de la acción de los compuestos antimicrobianos (Yuan *et al.* 2019).

La rizósfera, es una zona estrecha de suelo que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas, la colonización bacteriana de la rizósfera es fundamental para el establecimiento de interacciones planta-bacteria que resultan clave para la salud y la productividad de las plantas (Knights *et al.* 2021; Santoyo *et al.* 2021; Zhou *et al.* 2021). Las plantas influyen principalmente en la colonización bacteriana modulando la composición de los exudados de sus raíces, lo que da como resultado un gradiente de diversidad bacteriana con un mayor grado de especialización hacia la raíz, adicionalmente las interacciones bacteria-bacteria también son relevantes en la rizósfera involucrando tanto la cooperación como la competencia. Las interacciones cooperativas incluyen procesos como los intercambios de metabolitos, mientras que la producción de compuestos con actividad antimicrobiana corresponde a interacciones competitivas (Knights *et al.* 2021; Zhou *et al.* 2021)

Debido a las condiciones ambientales extremas, los microorganismos que viven en el continente antártico han adquirido estrategias de adaptación únicas para sobrevivir en este medio ambiente extremo (Tomova *et al.* 2015). Es de esperar, que la adaptación genética de los microorganismos a los factores de estrés antártico generen o incorporen nuevas vías metabólicas o genes para la síntesis de compuestos con estructuras únicas y actividad biológica específica, producidos como una ventaja competitiva para la colonización de su nicho ecológico (Bratchkova & Ivanova, 2011; Núñez-Montero & Barrientos, 2018) Por otro lado, los suelos antárticos con mínima contaminación antropogénica y bajas presiones de selección inducidas como consecuencia de las actividades humanas, deben reflejar solo el espectro de antibióticos naturales y los mecanismos de resistencia afines con poco, o ningún, impacto genético de las presiones de selección introducidas por el aporte de los compuestos antimicrobianos utilizados, de forma excesiva, tanto en el sector de la salud como en la industria alimentaria (Van Goethem *et al.* 2018). Finalmente, los microorganismos antárticos han sido reconocidos como una fuente, nueva y prometedora, para buscar nuevos metabolitos antimicrobianos con potencial de aplicación en diferentes sectores industriales, como las industrias de procesamiento de alimentos, química farmacéutica y cosmética (Asencio *et al.* 2014; Baricz *et al.* 2018; Bratchkova & Ivanova, 2011; Maida *et al.* 2014; Núñez-Montero *et al.* 2019; Núñez-Montero & Barrientos, 2018; Silva *et al.* 2018; Tedesco *et al.* 2016)

En el presente trabajo se determinó la respuesta de aislados bacterianos de suelo antártico a distintos grupos de antibióticos, así como su capacidad para producir sustancias antimicrobianas. El monitoreo de la resistencia a los antibióticos en bacterias de áreas remotas, como la Antártica, podría ser una herramienta útil tanto para determinar la resistencia natural que presentan las

Fig. 1: Ubicación de los sitios de muestreo.



bacterias como para evaluar la evolución del impacto antropogénico, mientras que contar con bacterias que presenten actividad antimicrobiana, podría ser una fuente valiosa de potenciales nuevos compuestos con posibles aplicaciones en el control de bacterias que presentan resistencia a los antibióticos actualmente utilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de suelo antártico

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron 9 muestras de suelo recolectadas en dos islas pertenecientes al Archipiélago de las islas Shetland del Sur (Fig. 1). Todas las muestras fueron tomadas en sectores alejados de las actividades antropogénicas, 3 muestras de suelo fueron obtenidas en la Bahía Chile de la Isla Greenwich ($62^{\circ} 28' 53''$ S; $59^{\circ} 37' 06''$ W), 3 de muestras en la Península Fildes de la isla Rey Jorge ($62^{\circ} 10' 09''$ S; $58^{\circ} 55' 47''$ W) y 3 muestras de suelo de rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv., recolectadas en las proximidades del Glaciar Collins ubicado en la Isla Rey Jorge ($62^{\circ} 10' 07''$ S; $58^{\circ} 51' 06''$ W).

Obtención de aislados bacterianos

Para aislar las bacterias de las muestras recolectadas, 4 g de suelo se mezclaron con 5 ml de agua estéril y se agitó por 10 minutos utilizando un agitador vórtex. El sobrenadante y diluciones seriadas, con un factor de dilución en base 10, se cultivaron en placas con agar

nutritivo diluido al tercio (Extracto de carne 1 g/L, peptona 1,67 g/L y agar 15 g/L). Las placas se cultivaron a 4°C, 10°C y 18°C durante 15 días. El crecimiento bacteriano se controló cada 24 horas y las colonias se transfirieron al mismo medio utilizado para el aislamiento. Todas las cepas bacterianas purificadas se conservaron a -80 °C en glicerol al 50%.

Espectro de acción antibacteriano de los aislados bacterianos antárticos

Se evaluó el efecto de las bacterias antárticas sobre el crecimiento de un panel de bacterias patógenas humanas mediante ensayos de antagonismo o actividad en placa (Corsini *et al.* 2010), donde la actividad de la molécula secretada por las bacterias antárticas se detecta mediante la inoculación de una colonia sobre un césped de la bacteria patógena indicadora y determinando si existe inhibición del crecimiento de la bacteria patógena. En breve, a partir de un cultivo de la bacteria indicadora crecido durante 48 h a 37 °C, se realizó una dilución de inóculo en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se agitó en vórtex y mediante una tórula estéril se realizó una siembra en césped sobre una placa de agar Mueller-Hinton, luego se inoculó una colonia de bacteria antártica sobre el césped de bacteria indicadora. El resultado de la actividad antagonista se determinó mediante la presencia o ausencia de una zona de inhibición de crecimiento sobre el césped de cada bacteria patógena analizada. Como control negativo se utilizó alícuotas de 5 µL del medio de cultivo (caldo nutritivo). Como control positivo se utilizó el antibiótico ampicilina (10 µg).

Perfil de susceptibilidad a antibióticos de los aislados bacterianos antárticos

La susceptibilidad de las bacterias antárticas a distintos antibióticos se determinó utilizando el método de difusión en disco de acuerdo con la metodología establecida por el Clinical and Laboratory Standards Institute (Weinstein & Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018). Para ello se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton y discos de antibióticos pertenecientes a distintos grupos (Tabla 1). Brevemente, se realizó un cultivo de la bacteria antártica a 18°C durante 48 h. A partir de éste, se diluyó un inóculo en agua destilada estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0,5 Mac Farland. A partir de este cultivo se sembró un inóculo con una tórula estéril sobre placas con agar Mueller-Hinton y sobre este inóculo se depositaron sensidiscos con los antibióticos seleccionados. Las placas se incubaron a 18°C durante 24 h. Finalmente, se midió el diámetro de la zona de inhibición generada por cada antibiótico y se consideró que, un aislado era resistente a un determinado antibiótico, cuando el diámetro de la zona de inhibición fue menor o igual a 15 mm, de susceptibilidad intermedia cuando el diámetro se encontraba entre 16 y 20 mm, y sensible cuando el diámetro de la zona de inhibición fue mayor a 20 mm (Tomova *et al.* 2015). Para el control de calidad del método se utilizaron cepas de *Escherichia coli* HB101 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Caracterización Fenotípica de aislados bacterianos seleccionados

Los aislados bacterianos se caracterizaron de acuerdo con su morfología, forma, textura y color de la colonia, adicionalmente, se realizó tinción de Gram (Bartholomew & Mittwer, 1952) y posterior análisis microscópico.

Tabla 1: Descripción de los antibióticos utilizados

| Grupo | Antibiótico | µg de antibiótico por disco | Abreviatura |
|------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------|
| Penicilinas | Ampicilina | 10 | AMP |
| | Amoxicilina/ácido clavulánico | 20/10 | AMC |
| Cefalosporinas | Cefepime | 30 | FEP |
| | Cefotaxima | 30 | CTX |
| | Cefuroxima | 30 | CXM |
| | Cefalotina | 30 | KF |
| | Ceftazidima | 30 | CAZ |
| Carbapenémicos | Ertapenem | 10 | ETP |
| | Imipenem | 10 | IPM |
| Aminoglicósidos | Gentamicina | 10 | CN |
| | Amikacina | 30 | AK |
| | Kanamicina | 30 | K |
| | Estreptomicina | 10 | S |
| Quinolonas | Ciprofloxacina | 5 | CIP |
| | Ácido Nalidixico | 30 | NA |
| Fenicoles | Cloramfenicol | 30 | C |
| Macrolidos | Azitromicina | 15 | AZM |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | 30 | TE |
| | Doxiciclina | 30 | DO |
| Sulfonamidas | Sulfafurazol | 300 | SF |
| Trimetoprim | Trimetoprim | 5 | W |

RESULTADOS

Aislados bacterianos de suelo antártico

Se estudiaron 75 aislados bacterianos obtenidos de las 9 muestras de suelo recolectadas en las islas Shetland del Sur. A partir de las colonias que crecieron a 4 °C, 10 °C y 18 °C se eligieron aquellas que presentaron distinta morfología, tamaño o coloración, para finalmente seleccionar 25 aislados del suelo de la isla Rey Jorge, 25 aislados de la isla Greenwich y 25 aislados de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

Espectro de acción antibacteriano de los aislados bacterianos antárticos

Se evaluó la capacidad de cada uno de los 75 aislado bacteriano seleccionado para inhibir el crecimiento de un set de bacterias patógenas humanas (Tabla 2). Como se muestra en la Fig. 2A el 36% de los aislados bacterianos (27 aislados) fue capaz de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena. Cuando se analizan los datos en función del lugar de muestreo se observa que para los aislados obtenidos de suelo de la Isla Rey Jorge solo 3 de los aislados (12%) fueron capaces de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria patógena (Fig. 2B), para el caso de los aislados correspondientes a la Isla Greenwich 18 aislados (72%) presentaron

Fig. 2: Actividad antimicrobiana de aislados de suelo antártico.

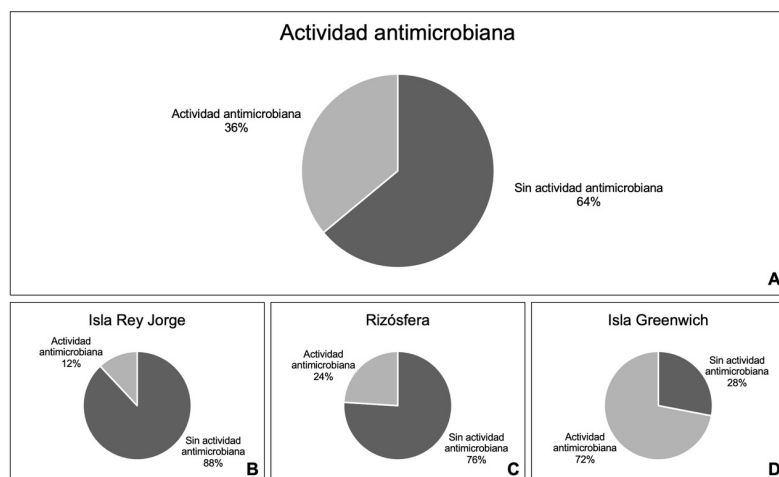
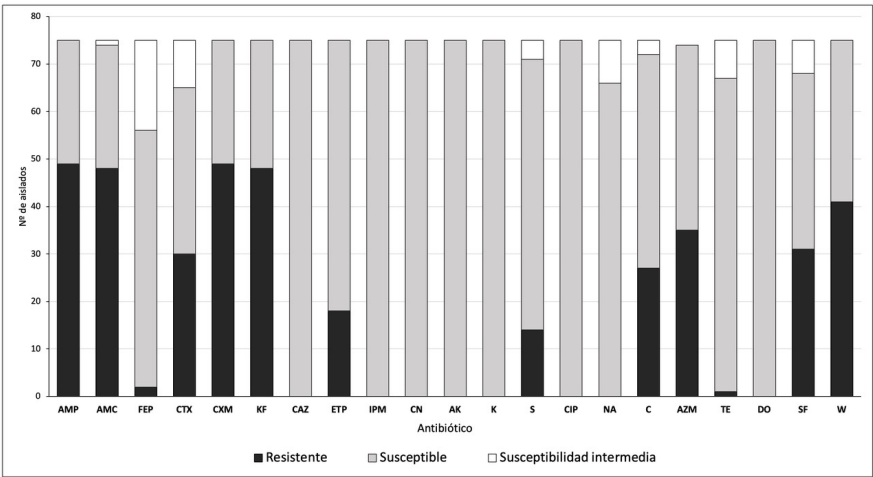


Tabla 2: Patrón de inhibición del crecimiento de aislados antárticos sobre bacterias patógenas. (-) No inhibe el crecimiento de la bacteria patógena, (+) Inhibe el crecimiento de la bacteria patógena.

| | | Gram negativo | | | | Gram positivo | | | |
|--|----------|-------------------------|---|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| | | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella enterica</i> serotipo Enteritidis | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Micrococcus sp.</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| Isla Greenwich | D1-4-12 | - | - | - | - | + | - | + | - |
| | D2-4-6 | - | - | - | - | + | + | + | - |
| | D2-4-7 | - | - | - | - | + | - | + | - |
| | D2-4-8 | - | - | - | - | + | + | + | - |
| | D2-4-10 | - | - | - | - | + | + | + | - |
| | D2-10-2 | - | - | - | - | + | + | - | - |
| | D2-10-6 | - | - | - | - | + | + | - | - |
| | D2-10-10 | - | - | - | - | + | + | + | - |
| | D2-10-14 | - | - | - | - | + | + | - | - |
| | D2-10-15 | - | - | - | - | + | + | - | - |
| | E1-4-10 | - | - | - | - | + | - | - | + |
| | E2-4-9 | - | - | - | - | + | - | + | + |
| | E2-4-10 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| | E2-10-3 | - | - | - | - | + | - | - | + |
| | E2-10-5 | - | - | - | - | + | - | - | + |
| | E2-10-6 | - | - | - | - | + | - | - | + |
| | F2-10-9 | - | - | - | - | + | - | - | + |
| | F2-10-13 | - | - | - | - | + | - | - | + |
| Rizósfera <i>Deschampsia antarctica</i> Desv. | M1-18-2 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | M1-18-4 | + | + | - | + | + | + | + | + |
| | M1-18-7 | + | + | - | + | + | + | + | + |
| | M1-4-4 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| | M1-4-8 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | M1-4-11 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Isla Rey Jorge | C1-4-7 | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | C1-4-16 | + | + | - | - | - | - | - | - |
| | C2-4-4 | - | - | - | - | + | + | - | - |

- No inhibe el crecimiento de la bacteria patógena
+ Inhibe el crecimiento de la bacteria patógena

Fig. 3: Patrón de susceptibilidad a los antibióticos de aislados microbianos de suelo antártico en función de cada antibiótico estudiado. Abreviaturas de los antibióticos en Tabla 1.



actividad antimicrobiana (Fig. 2C), finalmente para el caso de los aislados obtenidos de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv. 6 aislados (24%) mostraron actividad antimicrobiana sobre las bacterias patógenas estudiadas (Fig. 2D).

En la Tabla 2 se muestran los patrones de inhibición de crecimiento presentados por cada uno de los 27 aislados bacterianos sobre el panel de bacterias patógenas indicadoras seleccionadas para este estudio. Se puede observar que 19 aislados inhibieron el crecimiento solo de bacterias Gram positivo, 2 aislados inhibieron el crecimiento solo de bacterias Gram negativo y 6 aislados inhibieron el crecimiento tanto de bacterias Gram positivo como Gram negativo, éstos corresponden a todos los aislados provenientes de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

Perfil de susceptibilidad a antibióticos de los aislados bacterianos antárticos

En la Tabla 1 se presentan los antibióticos utilizados en el presente estudio junto con sus concentraciones y las abreviaturas que se utilizan en el presente texto.

En la Fig. 3, se puede observar que los aislados bacterianos estudiados mostraron resistencia a 14 (67%) de los 21 antibióticos testeados, que todos los aislados bacterianos fueron sensibles a ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM), gentamicina (CN), amikacina (AK), kanamicina (K), ciprofloxacina (CIP) y doxiciclina (DO). El 65% de los aislados bacterianos mostró resistencia a ampicilina (AMP) y cefuroxima (CXM) y el 64% mostró resistencia a amoxicilina-clavulanato (AMC) y cefalotina (KF).

En la Fig. 4A se observa que 3 aislados bacterianos (4%) fueron resistentes al menos a un antibiótico y 47 (63%) fueron multirresistentes (MDR, por sus siglas en inglés), es decir que presentaron resistencia al menos a un agente en tres o más grupos de antimicrobianos. Al analizar los resultados en función del lugar de muestreo, Fig. 4B, 4C y 4D, se observa que todos los aislados de suelo de la isla Greenwich y de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv. que presentan resistencia a antibióticos son MDR, solo en aislados obtenidos de suelo de la isla Rey Jorge se encontraron aislados con resistencia a antibiótico que no fueron MDR.

Fig. 4: Susceptibilidad a antibióticos de aislados bacterianos de suelo antártico. MDR: multiresistente (por sus siglas en inglés)

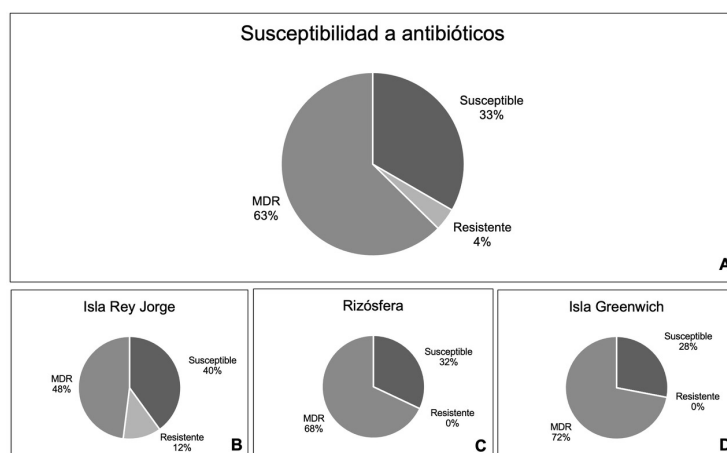
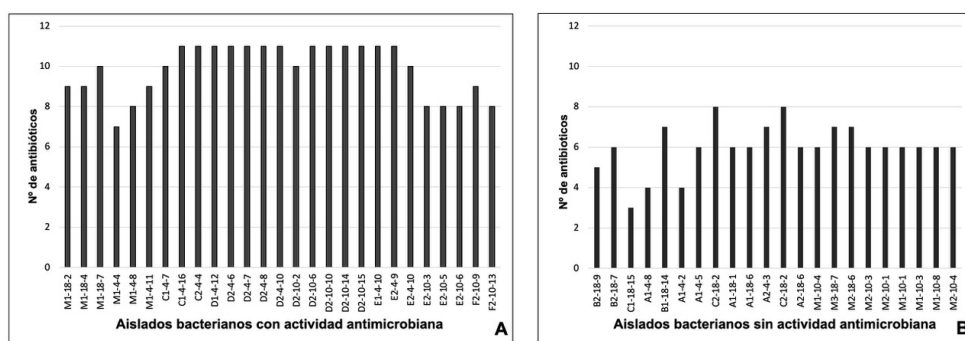


Fig. 5: Resistencia a antibióticos de aislados microbianos que presentan actividad antimicrobiana y de aislados que no presentan actividad antimicrobiana



Al comparar los resultados de resistencia a antibióticos con los patrones de actividad antimicrobiana se encontró que 26 aislados bacterianos (35%) no mostraron actividad antimicrobiana y fueron susceptibles a todos los antibióticos estudiados, mientras que los 27 aislados bacterianos (36%) con actividad antimicrobiana fueron MDR y en promedio presentaron resistentes a 10 antibióticos (Fig. 5A). Finalmente, 22 aislados bacterianos (29%) sin actividad antimicrobiana mostraron resistencia al menos a un antibiótico y cada aislado presentó resistencia a 6 antibióticos en promedio (Fig. 5B), ninguno de estos aislados fue resistente a ertapenem (ETP) o a cloranfenicol (C).

Caracterización Fenotípica de aislados bacterianos con actividad antimicrobiana y MDR

A los 27 aislados que presentaron actividad antimicrobiana y multiresistencia a antibióticos se les realizó tinción de Gram y obtención de imágenes de microscopía. Se observó que, entre los aislados que presentaron actividad antimicrobiana, solo 5 corresponden a bacterias Gram positivo (D2-4-10, D2-10-2, D2-10-10, D2-10-14 y E2-10-3), los restantes 22 aislados corresponden a bacilos cortos Gram negativo. Tres de los bacilos Gram negativo, presentan pigmentación violeta (E2-10-3, E2-10-5 y E2-10-6). Finalmente, 26 de los aislados forman colonias con bordes regulares, cóncavas y brillantes, mientras que un aislado presenta colonias con bordes estrellados (D2-10-2).

DISCUSIÓN

Aunque la investigación sobre la ecología microbiana antártica comenzó a principios de 1900 (Bratchkova & Ivanova, 2011), el medio ambiente antártico todavía representa una enorme reserva de biodiversidad microbiana inexplorada. Esta diversidad sin explorar ha dado lugar a un interés creciente en el estudio de microorganismos adaptados al frío con capacidad de producir nuevos metabolitos con posibles aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. En relación con esto, diferentes autores han informado que las bacterias antárticas son una fuente potencial de compuestos antimicrobianos y se han aislado bacterias con actividad antimicrobiana de varios hábitats antárticos, predominantemente suelos y agua de mar (Asencio *et al.* 2014; Baricz *et al.* 2018; Bratchkova & Ivanova, 2011; Lo Giudice *et al.* 2007; Maida *et al.* 2014; Núñez-Montero *et al.* 2019; Núñez-Montero & Barrientos, 2018; Silva *et al.* 2018; Tedesco *et al.* 2016; Tomova *et al.* 2015).

Si bien existe información, los datos sobre microorganismos antárticos que producen compuestos antimicrobianos son escasos en comparación con otros entornos ampliamente estudiados (Núñez-Montero & Barrientos, 2018), por lo que las bacterias aisladas del medio ambiente antártico siguen siendo en la actualidad una fuente potencial y poco explorada de nuevos compuestos antimicrobianos, que pueden ser ventajosos en aplicaciones alimentarias, terapéuticas, de salud e industriales en el futuro.

Entre las bacterias de la rizósfera más estudiadas se encuentran aquellas que tienen potenciales usos en la agricultura, entre éstas se destacan las que presentan propiedades promotoras del crecimiento de las plantas y aquellas que presentan capacidad de biocontrol, protegiéndolas de diferentes patógenos (Knights *et al.* 2021). Los microorganismos asociados a la rizósfera se encuentran en constante competencia por nutrientes, razón por la cual, muchos de ellos han desarrollado la capacidad de producir diversos compuestos antimicrobianos, como estrategia para competir con otros microorganismos por el establecimiento de un nicho ecológico específico (Santoyo *et al.* 2021). Debido a estas características, las bacterias asociadas a la rizósfera resultan interesantes para estudiar la producción de nuevos compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas humanas. En el caso particular del continente antártico, solo dos especies vasculares, *Deschampsia antarctica* Desv. y *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. han sido capaces de colonizar naturalmente algunas áreas costeras (Znój *et al.* 2021). Existen un grupo reducido de estudios relacionados con las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de plantas antárticas, entre los que se encuentran aquellos que describen la diversidad de las comunidades bacterianas rizosféricas (Barrientos-Díaz *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2010; Znój *et al.* 2021) y en los últimos años, estudios de secuenciación genómica de algunas bacterias con capacidad de inhibir el crecimiento de distintos organismos patógenos o que contienen genes asociados a la producción de compuestos antimicrobianos (Orellana *et al.* 2017; Pavón *et al.* 2017; Poblete-Morales *et al.* 2020).

En este contexto, en el presente estudio se encontró que el 36% de los aislados bacterianos estudiados son capaces de producir compuestos con actividad antimicrobiana que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas humanas. Estos aislados bacterianos se obtuvieron de suelos, sin intervención humana, en tres sectores diferentes y para cada sector se encontraron aislados con diferentes patrones de inhibición de bacterias patógenas. Los aislados de la isla Greenwich inhiben solo el crecimiento de bacterias patógenas Gram positivo, mientras que, los aislados de la isla Rey Jorge presentan un comportamiento mixto, ya que dos tienen capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativo y uno de los aislados es capaz de inhibir el crecimiento

de bacterias Gram positivo. Por otro lado, los aislados de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv. son capaces de inhibir el crecimiento tanto de bacterias Gram positivo como Gram negativo. Un comportamiento similar se ha reportado para cepas de *Pseudomonas* obtenidas de suelo y sedimento antártico que presentaron capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivo y Gram negativo (Tomova *et al.* 2015; Wong *et al.* 2011)

Entre los aislados que presentaron actividad antimicrobiana, 5 fueron caracterizados como bacteria Gram positivo, todos fueron obtenidos de muestras de suelo recolectadas en la Isla Greenwich y presentaron actividad antimicrobiana sobre al menos dos bacterias patógenas Gram positivo de las 4 estudiadas. Los 21 aislados bacterianos restantes fueron caracterizados como Gram negativo con diferentes patrones de inhibición, donde se puede destacar que 3 aislados (M1-18-2, M1-4-8 y M1-4-11) inhibieron el crecimiento de las 8 bacterias patógenas estudiadas.

Debido a que aún no se ha realizado la identificación de las bacterias que corresponden a cada aislado bacteriano, es probable, que algunos de estos aislados que fueron obtenidos de la misma muestra de suelo, que presentan el mismo patrón de inhibición de bacterias patógenas, el mismo patrón de susceptibilidad a antibióticos y comparten similares características tanto macroscópicas como microscópicas correspondan a la misma bacteria. Por ejemplo, esto podría ocurrir con los aislados E2-10-3, E2-10-5 y E2-10-6, que presentan pigmentación violeta, que fueron aislados de suelo de la isla Greenwich, que tienen actividad antibacteriana sobre las bacterias patógenas Gram positivo *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y que son resistentes a los mismos 8 antibióticos (AMP, AMC, CTX, KF, CXM, DO, CIP, SF).

La resistencia a los antimicrobianos es reconocida como una de las mayores amenazas para la salud pública mundial y la seguridad alimentaria debido al uso excesivo de estos compuestos en distintas actividades antropogénicas (Zhu *et al.* 2019), sin embargo la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural y antiguo (Yuan *et al.* 2019). Diversos estudios han mostrado la resistencia a los antibióticos en varios entornos considerados relativamente desprovistos de influencia antropogénica, incluidos los glaciares, comunidades humanas remotas, el océano profundo (Jara *et al.* 2020; Segawa *et al.* 2013; Yuan *et al.* 2019). La identificación de bacterias multirresistentes a los antibióticos en ambientes prístinos como el suelo Antártico puede tener dos explicaciones. La primera considera que la resistencia en un ambiente natural se debe a un fenotipo producto de una diseminación de genes de resistencia que posteriormente se incorporan a las bacterias por transferencia horizontal, lo que supone una fuente alóctona de origen de genes de resistencia, como son las fuentes antropogénicas o de aves y otros animales silvestres que diseminan por nuestro planeta la resistencia (McCann *et al.* 2019; Yuan *et al.* 2019). La segunda estima que la resistencia en un ambiente natural, se debe a que los genes de resistencia a los antibióticos están presentes en ese entorno con anterioridad, producto de la competencia entre los microorganismos por el ecosistema, esto significa que las bacterias han desarrollado estos mecanismos y los utilizan activamente para sobrevivir a la producción de antibióticos en el suelo por parte de otros microorganismos y obtienen así una ventaja competitiva de colonización del nicho ecológico (Van Goethem *et al.* 2018). Esto propone que las bacterias ancestrales probablemente obtuvieron su fenotipo de resistencia a los antibióticos a través de la transferencia horizontal de genes, pero que las bacterias modernas la heredaron directamente de sus células madre. Por lo tanto, los genes de resistencia en estos suelos remotos y no contaminados probablemente representan genes históricos funcionales eficientes que desde entonces se han heredado verticalmente durante generaciones (Van Goethem *et al.* 2018).

En el presente estudio se determinaron los patrones de susceptibilidad a antibióticos de 75 aislados de suelo antártico y se encontraron 3 aislados que fueron resistentes por lo menos a un antibiótico y 47 fueron MDR. El origen de las muestras de suelo estudiado no fue determinante cuando se analizaron los patrones de susceptibilidad a los antibióticos y para los tres sitios muestreados se encontró que los antibióticos del grupo ampicilinas (AMP y AMC) y dos cefalosporinas (CXM y KF) fueron los antibióticos a los cuales los aislados bacterianos fueron más resistentes. Es importante destacar que, por lo menos para un antibiótico de cada grupo estudiado se detectó resistencia en las cepas estudiadas. Estos resultados son interesantes ya que ninguna de las muestras estudiadas se encontraba bajo la influencia de actividades antropogénicas y, por lo tanto, estos patrones de resistencia a antibióticos corresponden a resistencia natural que presentan los aislados bacterianos. Existen pocos estudios que abordan la existencia de resistencia a antibióticos en el continente antártico y la mayoría de ellos se centran en buscar bacterias resistentes a antibióticos o genes de resistencia en sectores donde existe mayor presión de actividades antropogénicas y principalmente en medio acuático (De Souza *et al.* 2006; Jara *et al.* 2020; Na *et al.* 2019; Schiwon *et al.* 2013; Van Goethem *et al.* 2018), por lo tanto los resultados presentados en este trabajo presentan información novedosa relacionada con la resistencia natural que presentan las bacterias de suelos antárticos.

Desde otra perspectiva, se sabe que microorganismos productores de antibióticos pueden poseer mecanismos de autoprotección para evitar eficazmente los efectos de los antibióticos producidos por ellos mismos (Yuan *et al.* 2019) we analyzed ARGs in soil samples collected from relatively pristine Antarctica using metagenomic approaches. We identified 79 subtypes related to 12 antibiotic classes in Antarctic soils, in which ARGs related to multidrug and polypeptide were dominant. The characteristics of ARGs in Antarctic soils were significantly different from those in active sludge, chicken feces and swine feces, in terms of composition, abundance and potential transferability. ARG subtypes (e.g., *bacA*, *ceoB*, *dfrE*, *mdtB*, *amrB*, and *acrB*). En el presente estudio encontramos que los aislados bacterianos que presentan actividad antimicrobiana, son los mismos que presentan resistencia a un mayor número de antibióticos (Fig. 5A), por lo tanto la mayor resistencia a los antibióticos podría estar relacionada con la capacidad de estos aislados bacterianos de generar compuestos que los protejan de los compuestos antibacterianos que ellos mismos generan, mientras que la resistencia presentada por aislados que no producen actividad antimicrobiana podría relacionarse con un intercambio por transferencia genética horizontal de una serie de mecanismos de resistencia a los antibióticos que les permita sobrevivir en un entorno con microorganismos productores de compuestos antimicrobianos (Van Goethem *et al.* 2018).

Los resultados presentados en este trabajo muestran que los aislados bacterianos que combinan actividad antimicrobiana y resistencia múltiple a los antibióticos son especialmente interesantes para continuar con su estudio, ya que es probable que al presentar estas dos capacidades tengan una ventaja competitiva, frente a otras bacterias, que les permita sobrevivir en un entorno hostil. Adicionalmente, estos aislados bacterianos entregan información valiosa relacionada con la susceptibilidad natural a los antibióticos que presentan las bacterias de suelos antárticos y finalmente podrían transformarse en nuevas fuentes de compuestos activos para el control de microorganismos patógenos que presentan multirresistencia a los antibióticos que actualmente se utilizan.

LITERATURA CITADA

- Asencio, G., Lavin, P., Alegría, K., Domínguez, M., Bello, H., González-Rocha, G., & González-Aravena, M. (2014). Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against 2 multi-resistant Gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.001>
- Baricz, A., Teban, A., Chiriac, C. M., Szekeres, E., Farkas, A., Nica, M., Dascălu, A., Opreșan, C., Lavin, P., & Coman, C. (2018). Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6>
- Barrientos-Díaz, L., Gidekel, M., & Gutiérrez-Moraga, A. (2008). Characterization of rhizospheric bacteria isolated from *Deschampsia antarctica* Desv. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2289-2296. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9743-1>
- Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The Gram stain. *Bacteriological Reviews*, 16(1), 1-29. <https://doi.org/10.1128/br.16.1.1-29.1952>
- Bratchkova, A., & Ivanova, V. (2011). Bioactive metabolites produced by microorganisms collected in Antarctica and the Arctic. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25(SUPPL. 4), 1-7. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0116>
- Corsini, G., Karahanian, E., Tello, M., Fernandez, K., Rivero, D., Saavedra, J. M., & Ferrer, A. (2010). Purification and characterization of the antimicrobial peptide microcin N: Properties of the antimicrobial peptide microcin N. *FEMS Microbiology Letters*, 312(2), 119-125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02106.x>
- De Souza, M.-J., Nair, S., Loka Bharathi, P. A., & Chandramohan, D. (2006). Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology*, 15(4), 379-384. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0068-2>
- Jara, D., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., Cigarroa, C., Fernández, P., Vergara, L., Quezada-Aguiluz, M., Opazo-Capurro, A., Lima, C. A., & González-Rocha, G. (2020). Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Scientific Reports*, 10(1), 3145. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60035-0>
- Knights, H. E., Jorriin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 428-444. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>
- Lo Giudice, A., Brilli, M., Bruni, V., De Domenico, M., Fani, R., & Michaud, L. (2007). Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea): Antagonism among psychrotrophic Antarctic marine bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(3), 383-396. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00300.x>
- Maida, I., Fondi, M., Papaleo, M. C., Perrin, E., Orlandini, V., Emiliani, G., de Pascale, D., Parrilli, E., Tutino, M. L., Michaud, L., Lo Giudice, A., Romoli, R., Bartolucci, G., & Fani, R. (2014). Phenotypic and genomic characterization of the Antarctic bacterium *Gillisia* sp. CAL575, a producer of antimicrobial compounds. *Extremophiles*, 18(1), 35-49. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0590-0>
- McCann, C. M., Christgen, B., Roberts, J. A., Su, J.-Q., Arnold, K. E., Gray, N. D., Zhu, Y.-G., & Graham, D. W. (2019). Understanding drivers of antibiotic resistance genes in High Arctic soil ecosystems. *Environment International*, 125, 497-504. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.034>
- Na, G., Wang, C., Gao, H., Li, R., Jin, S., Zhang, W., & Zong, H. (2019). The occurrence of sulfonamide and quinolone resistance genes at the Fildes Peninsula in Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110503. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110503>
- Núñez-Montero, K., & Barrientos, L. (2018). Advances in antarctic research for antimicrobial discovery: A comprehensive narrative review of bacteria from antarctic environments as potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance. *Antibiotics*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040090>
- Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Abanto, M., Maruyama, F., Jorquera, M. A., Santos, A., Martínez-Urtaza, J., & Barrientos, L. (2019). Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43960-7>

- Orellana, P., Pavón, A., Céspedes, S., Salazar, L., Gutiérrez, A., Castillo, D., & Corsini, G. (2017). Draft Genome Sequence of Chilean Antarctic *Pseudomonas* sp. Strain K2115. *Genome Announcements*, 5(33). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00771-17>
- Pavón, A., Orellana, P., Salazar, L., Céspedes, S., Muiño, L., Gutiérrez, A., Castillo, D., & Corsini, G. (2017). Draft Genome Sequence of *Bacillus* sp. Strain K2117, Isolated from the Rhizosphere of *Deschampsia antarctica* Desv. *Genome Announcements*, 5(33). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00786-17>
- Poblete-Morales, M., Rabert, C., Olea, A. F., Carrasco, H., Calderón, R., Corsini, G., & Silva-Moreno, E. (2020). Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain AN3A02, Isolated from Rhizosphere of *Deschampsia antarctica* Desv., with Antagonism against *Botrytis cinerea*. *Microbiology Resource Announcements*, 9(21). <https://doi.org/10.1128/MRA.00320-20>
- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
- Schiwon, K., Arends, K., Rogowski, K. M., Fürch, S., Prescha, K., Sakinc, T., Van Houdt, R., Werner, G., & Grohmann, E. (2013). Comparison of Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and Conjugative Transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* Isolates from International Space Station and Antarctic Research Station Concordia. *Microbial Ecology*, 65(3), 638–651. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0193-4>
- Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K., Motoyama, H., Kohshima, S., & Ushida, K. (2013). Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments: Antibiotic resistance genes in snow and ice. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 127–134. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12011>
- Silva, T. R., Duarte, A. W. F., Passarini, M. R. Z., Ruiz, A. L. T. G., Franco, C. H., Moraes, C. B., de Melo, I. S., Rodrigues, R. A., Fantinatti-Garboggini, F., & Oliveira, V. M. (2018). Bacteria from Antarctic environments: Diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biology*, 41(7), 1505–1519. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y>
- Tedesco, P., Maida, I., Esposito, F. P., Tortorella, E., Subko, K., Ezeofor, C. C., Zhang, Y., Tabudravu, J., Jaspars, M., Fani, R., & De Pascale, D. (2016). Antimicrobial activity of monoramnholipids produced by bacterial strains isolated from the Ross Sea (Antarctica). *Marine Drugs*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/md14050083>
- Teixeira, L. C. R. S., Peixoto, R. S., Cury, J. C., Sul, W. J., Pellizari, V. H., Tiedje, J., & Rosado, A. S. (2010). Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *The ISME Journal*, 4(8), 989–1001. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.35>
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lazarkevich, I., & Vasileva-Tonkova, E. (2015). Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. *Frontiers in Life Science*, 8(4), 348–357. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1044130>
- Van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K. I., Van De Peer, Y., Cowan, D. A., & Makhlanayane, T. P. (2018). A reservoir of ‘historical’ antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, 6(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0424-5>
- Weinstein, M. P. & Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*.
- Wong, C., Tam, H., Alias, S., González, M., González-Rocha, G., & Domínguez-Yévenes, M. (2011). *Pseudomonas* and *Pedobacter* isolates from King George Island inhibited the growth of foodborne pathogens. *Polish Polar Research*, 32(1), 3–14. <https://doi.org/10.2478/v10183-011-0003-y>
- Yuan, K., Yu, K., Yang, R., Zhang, Q., Yang, Y., Chen, E., Lin, L., Luan, T., Chen, W., & Chen, B. (2019). Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in Antarctic soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.099>
- Zhou, L., Song, C., Li, Z., & Kuipers, O. P. (2021). Antimicrobial activity screening of rhizosphere soil bacteria from tomato and genome-based analysis of their antimicrobial biosynthetic potential. *BMC Genomics*, 22(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07346-8>

- Zhu, Y.-G., Zhao, Y., Zhu, D., Gillings, M., Penuelas, J., Ok, Y. S., Capon, A., & Banwart, S. (2019). Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. *Environment International*, 131, 105059. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105059>
- Znój, A., Gawor, J., Gromadka, R., Chwedorzewska, K. J., & Grzesiak, J. (2021). Root-Associated Bacteria Community Characteristics of Antarctic Plants: *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*—a Comparison. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01891-9>

Apéndice: Afiliación declara por cada uno de los autores

| Número afiliación | Nombre de la institución y/o organización Afiliación |
|-------------------|---|
| 1 | Centro de Investigación y Monitoreo Ambiental Antártico (CIMAA), Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Magallanes, Avenida Bulnes 01855, Punta Arenas, Chile |
| 2 | Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Llano Subercaseaux 2801, Piso 5, Santiago, Chile. |
| 3 | Dirección de Desarrollo y Transferencia, Universidad de Las Américas, Chile. |
| 4 | Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Departamento de Producción Agropecuaria Universidad de La Frontera, Temuco. Chile |

| Autor | Afiliación |
|----------------------|------------|
| Nancy Calisto | 1,2 |
| Laura Navarro | 2 |
| Paz Orellana | 2 |
| Guillermo Wiese | 2 |
| Claudio Gómez | 1 |
| Lorena Salazar | 2 |
| Piedad Cortés-Cortés | 3 |
| Ana Gutiérrez-Moraga | 2, 4 |
| Manuel Gidekel | 2 |
| Gino Corsini | 2 |