

ARTICULO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

Actividad antibiótica residual de amikacina caduca versus *Bacillus clausii*

Residual antibiotic activity of expired amikacin versus *Bacillus clausii*

Mex-Alvarez, Rafael Manuel de Jesús†*, Guillen-Morales, María Magali, Garma-Quen, Patricia Margarita, Yanez-Nava David, Medina-Garcia Dianelly M. y Chan-Martínez Roger Enrique

Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche. Av. Ex Hacienda Kalá S/N, San Francisco de Campeche, México

Article history:

Received September 7, 2023

Received in revised from
September 5, 2023

Accepted September 12, 2023

Available online October 31, 2023

* Corresponding author:

Mex-Alvarez, Rafael Manuel de Jesús

Electronic mail address:

rafammex@uacam.mx

RESUMEN

Bacillus clausii es una bacteria típica del suelo por ello puede servir como un bioindicador útil para estimar el impacto de los fármacos en la microbiota de suelos y para inferir la afectación a este ecosistema por contaminación con medicamentos desechados inapropiadamente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibiótica residual de amikacinas en medicamentos caducos versus *Bacillus clausii* para conocer la permanencia de su bioactividad después de la fecha de caducidad; para ello, se midió la concentración mínima inhibitoria de amikacinas caducas por el método de dilución en microplacas empleando MTT como revelador del crecimiento; se observó que medicamentos de hasta 60 meses después de haber caducado mantienen una actividad antibiótica significativa versus *B. clausii* por lo cual aún afectan a la ecología microbiana de bacterias del suelo expuesto a este tipo de medicamentos.

Palabras clave: *Bacillus clausii*, amikacina, actividad antimicrobiana residual

ABSTRACT

Bacillus clausii is a typical soil bacteria, therefore it can serve as a useful bioindicator to estimate the impact of drugs on the soil microbiota and to infer the impact on this ecosystem due to contamination with inappropriately discarded drugs. The objective of this work was to evaluate the residual antibiotic activity of amikacins in expired medications versus *Bacillus clausii* to determine the permanence of its bioactivity after the expiration date; To this end, the minimum inhibitory concentration of expired amikacins was measured by the dilution method in microplates using MTT as a growth revealer; It was observed that medications up to 60 months after expiration maintain significant antibiotic activity versus *B. clausii*, which is why they still affect the microbial ecology of soil bacteria exposed to this type of medication.

Keywords: *Bacillus clausii*, amikacin, residual antimicrobial activity

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública que se ha agravado principalmente por la contaminación del suelo y agua debido a una incorrecta disposición final de los mismos, proveniente de las industrias (ganadería, acuicultura o farmacéutica) o por verter fluidos

biológicos de animales o humanos que reciben antibioticoterapia; esto ha ocasionado que los antibióticos sean considerados contaminantes emergentes que fomenta el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos expuestos como parte de su adaptación evolutiva [1,2]. Las bacterias patógenas para los seres humanos y animales se liberan constantemente al

medio ambiente a través de aguas residuales y así acceden al medio acuático; el agua representa tanto la forma de diseminación de los microorganismos resistentes como la ruta de introducción de los genes de resistencias a los ecosistemas bacterianos naturales y por ello las bacterias no patógenas pueden servir como reservorio de genes de resistencia [3-5].

La contaminación ambiental por antibióticos también afecta al suelo y pueden alterar el equilibrio ecológico pues las bacterias del suelo presentan una doble funcionalidad: ayudan en la inhibición de patógenos y favorecen el crecimiento de plantas; entre las bacterias de suelo destacan los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* [6,7]. El género *Bacillus* está constituido por bacterias de vida libre que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, además de poseer una diversidad funcional en la promoción del crecimiento de las plantas y el desarrollo de sus raíces así como favorecer una mayor absorción de agua y nutrientes; generalmente, las bacterias del género *Bacillus* están asociadas a las raíces de las plantas, es decir, son parte de la rizósfera [8,9]. Entre las bacterias del género *Bacillus* se encuentra *B. clausii* que es un microorganismo alcalifílico aislado del suelo que se emplea como probiótico en el medicamento enterogermina® [10-12]; por ello puede usarse como un organismo de referencia para el estudio de cómo afectan los antibióticos a la ecología del suelo y representa una aproximación inicial a la ecofarmacovigilancia de los antibióticos, así el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antibiótica residual de amikacinas caducas versus *B. clausii* para conocer cómo afecta la fecha de caducidad a la actividad antibiótica y estimar el impacto que representa la contaminación ambiental por antibióticos caducos.

MÉTODOLÓGÍA

Los medicamentos caducos fueron donados por el centro de información de medicamentos de la facultad de ciencias químico biológicas provenientes de sus campañas de colectas de

medicamentos como medio de concientización y participación social en problemáticas actuales de salud ambiental; en el laboratorio de análisis de medicamentos, se seleccionó los medicamentos que contenían como único principio activo amikacina y se verificó que contuvieran dosis suficiente para realizar el análisis para determinar su concentración remanente y su actividad antibiótica residual, se registró el lote, dosis, fabricante y fecha de caducidad de los medicamentos.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se usó la técnica de microdilución en placas de 96 pozos con capacidad de 300 mL cada pozo; primero, se colocó 50 mL de caldo de cultivo Mueller Hinton a doble concentración en cada pozo, posteriormente se mezcló con 50 mL de antibiótico para realizar una dilución seriada 1:2, se eliminó 50 mL de la mezcla en el último pozo para disponer del mismo volumen en todos los pozos; luego, se adicionó el inóculo correspondiente de *Bacillus clausii* de turbidez comparable al estándar 1.0 de Mc Farland, leída en un nefelómetro digital (10^6 - 10^8 UFC/mL). Se incubó las microplacas durante 24 h a 37°C y posteriormente se adicionó 10 mL de una solución de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) al 0.25%, se incubó nuevamente a 37 °C por 20 horas más. Terminado el tiempo de incubación se leyó visualmente los resultados determinándose el pozo con mayor dilución que inhibió el crecimiento bacteriano, es decir, el pozo con ausencia del vire del colorante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1** se muestran las CMI obtenidas para las amikacinas caducas; en ella se puede observar que la actividad antibiótica de los medicamentos caducos muestra una tendencia inversamente proporcional al tiempo de caducidad, es decir, la actividad antibiótica disminuye (aumento de su CMI) proporcionalmente al tiempo de caducidad, las CMI se encontraron entre un mínimo de 40 mg/L hasta un máximo de 500 mg/L.

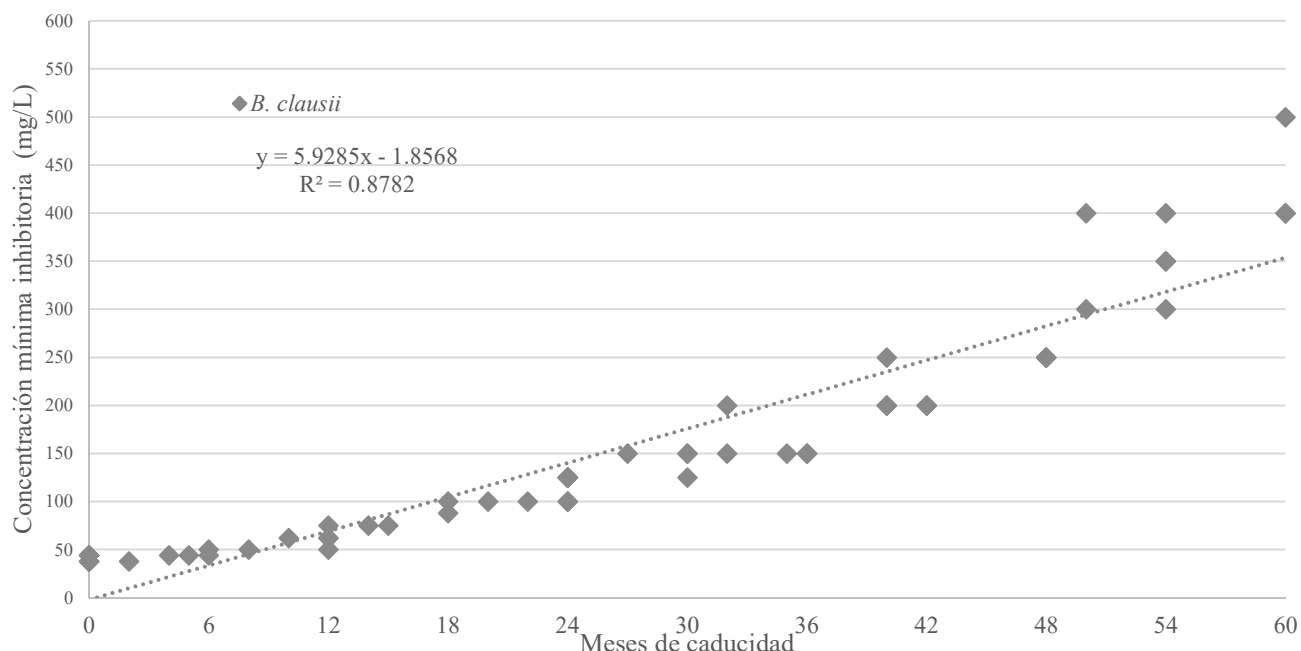


Figura 1. Concentraciones mínimas inhibitorias de amikacina en medicamentos caducos vs *Bacillus clausii* (Fuente: elaboración propia)

Figure 1. Minimum inhibitory concentrations of amikacin in expired medications vs *Bacillus clausii* (Source: own elaboration).

En la **Figura 2** se relaciona la concentración residual con la CMI del medicamento caduco, se puede observar que la forma que se adopta es similar a una curva dosis-respuesta; la correlación es mejor a menores valores de CMI debido a que

por la naturaleza del método empleado es semicuantitativo con valores discretos y se hace más preciso a concentraciones más bajas (diluciones mayores) en comparación con valores más altos.

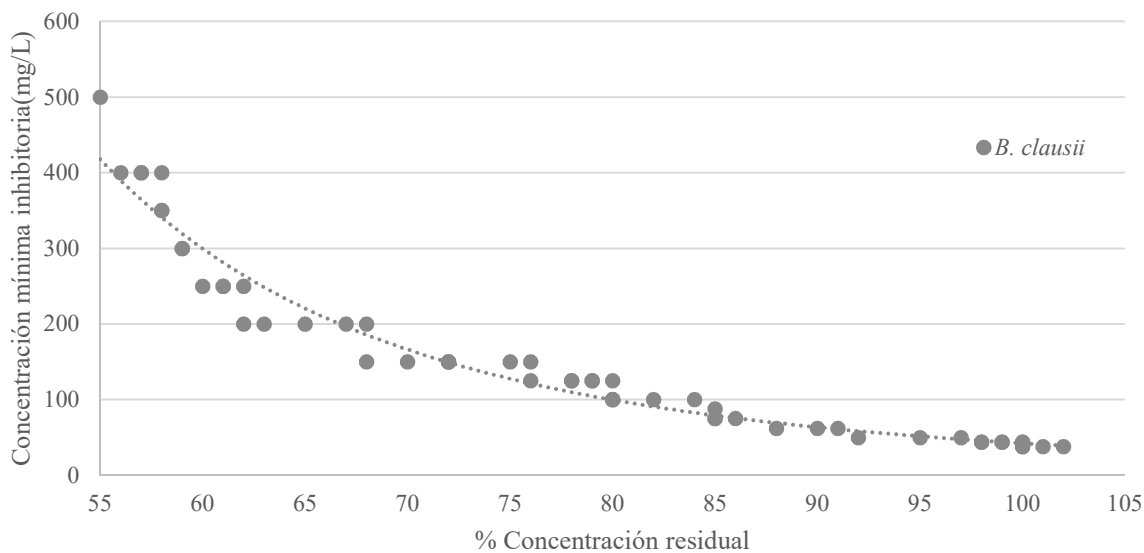


Figura 2. Relación entre la concentración residual del principio activo y la CMI exhibida
Figure 2. Relationship between the residual concentration of the active ingredient and the MIC displayed

Los antibióticos como contaminantes afectan gravemente la salud ambiental, entendida esta última como el área de la salud pública encargada de evaluar los riesgos y daños a la salud producto de la degradación y contaminación ambiental, además de proponer y evaluar programas para su reducción; porque las bacterias están ampliamente distribuidas en suelo y aguas y por ello están constantemente en contacto con antibióticos que provocan una presión selectiva sobre las bacterias ambientales para generar resistencia [13,14].

Los antimicrobianos como la amikacina son agentes quimioterapéuticos de amplio uso tanto en humanos como en animales; el abuso de su empleo clínico y en industrias como la agricultura, acuicultura y ganadera impactan de manera negativa al fomentar la aparición de resistencia y su diseminación en el ambiente; por ello, es importante estudiar y evaluar su comportamiento aún después de caducos, no solamente para conocer cuánto tarda en descomponerse y la remanencia de su actividad antibiótica sino para establecer los fundamentos científicos que permitan disminuir su impacto ecológico al apoyar en la decisión de elegir la alternativa más oportuna de mitigación de los efectos de vertido de antimicrobianos al medio ambiente, investigar métodos de tratamiento de residuos más efectivos y para conducir a la elaboración de políticas públicas más adecuadas y actuales [13-15].

Gran parte de los antibióticos se desechan de manera inadecuada, tanto directamente al botarlos a la basura municipal o en patios o a través del inodoro o desagüe donde contaminan el ambiente por medio de aguas residuales que eventualmente impactarán al suelo cuando tengan contacto con éste; esto afecta la ecología microbiana del suelo y agua con las posibles afectaciones en productores primarios y demás elementos del ecosistema [13,14]. Los resultados de la CMI en amikacina demuestran que la actividad del antibiótico se mantiene por largo tiempo, pues los medicamentos evaluados tienen hasta 5 años de caducidad y

mantiene una acción antibiótica significativa, también se determinó que el principio activo residual a los 60 meses era superior al 55%; esto implica que desechar un medicamento al medio ambiente aunque esté caduco genera un impacto sobre los microorganismos y daña apreciablemente al medio ambiente [13,14].

La permanencia de una actividad antibiótica significativa aún después de cinco años de caducidad es de interés para la salud ambiental por el riesgo de afectación remanente al ecosistema, asimismo, en este trabajo solamente se monitoreó la acción de la amikacina como fármaco, es decir, como inhibidor del crecimiento bacteriano; pero cabe mencionar que como molécula química los cambios originados por la caducidad y exposición a diversos factores ambientales, principalmente a la luz y a la temperatura, pueden ocasionar un incremento en su toxicidad por lo que se recomienda continuar esta línea de investigación para aclarar si su ecotoxicidad disminuye o aumentan respecto al tiempo de caducidad y cómo se afecta con la luz y la temperatura [16-20].

CONCLUSIÓN

La concentración mínima inhibitoria de amikacina versus *Bacillus clausii* aumenta de manera directamente proporcional al tiempo de caducidad y se observa una acción residual antibiótica significativa hasta 60 meses después de su vencimiento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Barrantes Jiménez, Kenia, Chacón Jiménez, Luz, & Arias Andrés, María. (2022). El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2), 305-329. <https://dx.doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590>

2. Sin autor. (2011). Contaminación ambiental - herramientas para rastrear la resistencia a los antibióticos. *Salud Pública de México*, 53(3), 270-276.
3. Lara, M, Torres, M, Baez, M, Albertini, S. (2019). Aspectos generales del uso de antimicrobianos y su interacción con el medio ambiente: una problemática emergente. *Compend. cienc. vet.*, 09 (02), 24-37. doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2019.09.02.24-37
4. Rocha, Claudio, Reynolds, Nathanael D, & Simons, Mark P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(1), 139-145.
5. Ramírez-Cando, Lenin Javier, Chicaiza Ramírez, Sabrina Estefania, Ramos López, Allan David, & Álvarez, César Iván. (2019). Detección de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas como contaminantes emergentes en los ríos San Pedro y Pita del cantón Rumiñahui. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 30(2), 88-102. <https://doi.org/10.17163/lgr.n30.2019.08>
6. Fraire Mayorga, Atzin, De la Cruz Rodríguez, Yadira Yumiko, Alvarado Gutiérrez, Alejandro, Alvarado Rodríguez, Miguel, Fraire Velázquez, Saúl. (2020). Bacterias *Bacillus* sp. de suelo y de rizósfera en consorcio para el biocontrol de fitopatógenos de la raíz en *Capsicum annum* L. *Investigación científica*, 14 (2), 28-38.
7. Correa Rivas, Krismay Anais, Bravo Torrealba, María Vanessa, Silva Alvarado, Ricardo Alonso, & Montiel, Marynes. (2015). Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 83-88.
8. Tanya Morocho, Mariuxi, & Leiva-Mora, Michel. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103.
9. João Alves, Lex, Wisoczynski de Sene, Danielly, Ferreira de Paula, Gabriel, Bueno Demétrio, Gilberto, & Sussumu Matsumoto, Leopoldo. (2021). Influencia de *Bacillus* sp. sobre los atributos químicos y microbiológicos del suelo y el desarrollo de la soja y el maíz. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(3), 383-393.
10. Lee, S. H., & Park, D. H. (2008). Isolation and physiological characterization of *Bacillus clausii* SKAL-16 isolated from wastewater. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(12), 1908-1914.
11. Lee, N. K., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food science and biotechnology*, 28(5), 1297-1305. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9>
12. Núñez Torres, Oscar P, Arévalo Castro, Renato P, E. Kelly, Gerardo, & R. Guerrero, Jorge. (2017). Efecto de la Enterogermina (Esporas de *Bacillus clausii*) en el Comportamiento Productivo de Pollos de Engorde. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 861-868. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13882>
13. Riojas-Rodríguez, Horacio, Schilman, Astrid, López-Carrillo, Lizbeth, & Finkelman, Jacobo. (2013). La salud ambiental en México: situación actual y perspectivas futuras. *Salud Pública de México*, 55(6), 638-649.
14. Lara, M, Torres, M, Baez, M, & Albertini, S. (2019). Aspectos Generales del uso de antimicrobianos y su interacción con el medio ambiente: una problemática emergente. *Compend. Cienc. Vet.*, 09 (02), 24-37.
15. Fernandez Rodríguez, Ronield Elias, Bolivar-Anillo, Hernando, Hoyos Turcios, Carlos, Carrillo Garcia, Laura, Serrano Hernandez, Maria, & Abdellah, Ezzanad. (2020). Resistencia antibiótica: el papel del hombre, los animales y el medio ambiente. *Revista Salud Uninorte*, 36(1), 298-324. Epub May 31, 2021. <https://doi.org/10.14482/sun.36.1.615>
16. Quispe, Cristina, Astudillo, Luis, Villasenor, Jorge, & Delgadillo, Álvaro. (2010). Ozonización del antibiótico Trimetoprim: Evolución de la toxicidad durante la degradación. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(2), 149-155.
17. Bila, Daniele Maia, Dezotti, Márcia. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Química Nova [online]*, 26(4), 523-530.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>

18. Jiménez Cartagena, Claudio. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 143-153.
19. Silva Graciani, Fernanda, & Bonora Vidrih Ferreira, Gabriel Luis. (2014). Impacto ambiental de los medicamentos y su regulación en Brasil. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(2), 265-270.
20. Calisto Ulloa, Nancy, Gómez Fuentes, Claudio, & Muñoz, Patricio. (2018). Resistencia a antibióticos en bacterias recolectadas en agua de mar en las proximidades de bases antárticas. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 46(3), 29-39. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-686X2018000300029>



Mexican Academy of Health Education A.C. Membership: Our commitment is to keep professionals and students in training updated in this constantly evolving area. If you are interested in being part of our community and accessing exclusive benefits, the first step is to obtain your membership. Join us and stay up to date with advances in health education.

MEMBERSHIP SUBSCRIPTION IS FREE.
Request your membership to the
<https://forms.gle/kVYBYRdRnYZff14y9>

