

El antibiograma. Un recurso en el laboratorio de Educación Secundaria

José Pedro López Pérez¹; Raquel Boronat Gil²

¹IES "Felipe II". 30870. Mazarrón. Murcia. España. josepedro.lopez@murciaeduca.es

²IES "Antonio Menárguez Costa". 30710. Los Alcázares. Murcia. España.

[Recibido en abril de 2011, aceptado en julio de 2011]

En esta comunicación se presentan las directrices necesarias para lograr la observación, en el laboratorio de Biología de Educación Secundaria, de la capacidad antimicrobiana de algunos compuestos, en especial de los antibióticos, y su repercusión en el fortalecimiento de la enseñanza de las ciencias en materia de salud.

Palabras clave: Antibiograma; Penicilina G; Educación Secundaria.

The antibiogram. A resource in compulsory secondary education laboratory

In this paper we show the necessary guidelines to ensure the observation, in the Biology laboratory of compulsory secondary education, of antimicrobial capacity of some compounds, especially antibiotics, and their impact on the strengthening of science education on health.

Keywords: Antibiogram; Penicillin G; Secondary Education.

El estudio de las enfermedades en la Educación Secundaria Obligatoria (3º ESO, *Biología y Geología, Bloque II. Las personas y la salud*) (Anónimo, 2007) y Bachillerato (1º de Bachillerato, *Ciencias Mundo Contemporáneo, Bloque III. Vivir más, vivir mejor*; 2º Bachillerato, *Biología. Bloque IV. El mundo de los microorganismos y sus aplicaciones*) (Anónimo, 2008), lleva consigo la observación y comentario del descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina, por el médico británico Alexander Fleming (1928). En las ilustraciones de los diferentes libros de texto de utilidad para estos cursos académicos, aparece un antibiograma con el objetivo de poder observar el poder antimicrobiano de los productos de secreción de algunas bacterias y hongos. No obstante, en ningún momento se refleja la metodología para la realización de esta técnica, de utilidad en los laboratorios de microbiología y con amplia repercusión en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Cuando en uno de estos laboratorios de investigación se realiza una prueba basada en el empleo de antimicrobianos, con el objetivo de determinar su sensibilidad frente a un microorganismo, es preciso tener presente el empleo de costoso material de trabajo, basado en el uso de cepas bacterianas estandarizadas, medios de cultivo microbiano (Agar de Mueller-Hinton¹), así como discos cargados de una concentración fija de antibiótico.

No obstante, en el laboratorio de Educación Secundaria, de manera recreativa y con una metodología de trabajo que muestra todo un rigor científico para lograr el éxito, es posible la realización de un antibiograma mediante el empleo de antibióticos, que los alumnos pueden proporcionar de sus casas (sobrantes, tras sufrir un episodio de infección bacteriana algún miembro de la familia) o de compra en farmacia. En esta experiencia, el antibiótico que se ha empleado es Penicilina G (Bencilpenicilina sódica, PENILEVEL, Polvo y disolvente para solución inyectable, de Laboratorios ERN, S.A.; de venta en farmacia bajo prescripción médica). La cepa microbiana a elección es una de las que los propios alumnos han podido

¹ Composición en gramos por litro de agua destilada: infusión de carne, 300 g; peptona ácida de caseína, 170.5 g; almidón, 1.5 g; agar, 15 g; pH=7.3±0.2.

aislar de sus manos, según la metodología descrita por López (2009) en esta revista. Del mismo modo, la composición del medio de cultivo es la que recomienda este autor para el cultivo de microorganismos.

El antibiograma que se va a realizar en esta práctica, así como el que se lleva a cabo en los laboratorios de microbiología de investigación y centros hospitalarios, sigue la técnica basada en las experiencias clásicas de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1960). Según estos autores, el microorganismo deberá inocularse en la superficie de una placa de agar, sobre la cual se colocarán discos impregnados con una concentración conocida de antibiótico. Las placas se incubarán durante 15 horas a 35 °C. Durante la incubación, el antibiótico difundirá radialmente desde el disco a través del agar de cultivo, por lo que su concentración irá disminuyendo a medida que se aleja del disco.

La experiencia comienza varios días antes con el aislamiento y posterior siembra en superficie de los microorganismos de las placas de recuentos efectuados sobre las manos de los alumnos. Es preferible, para el tipo de antibiótico que se va a utilizar, aislar microorganismos Gram positivos,² seleccionándose las colonias de coloración amarilla (*Micrococcus luteus*) o blanca (*Bacillus* sp). Es oportuno llamar la atención al alumno en este punto sobre la precaución ante el uso de cultivos microbianos, donde bajo ninguna circunstancia deben tocarse con las manos.

Tras el cultivo de los microorganismos, la práctica comienza en el laboratorio con la preparación del antibiótico y la posterior dilución (figura 1-A). Para ello, el polvo de antibiótico se disolverá en 10 ml de agua del grifo. 1 ml de esta disolución se verterá en un tubo de ensayo provisto de 9 ml de agua (de esta manera se diluirá la solución madre de antibiótico 10 veces). Nos interesa llevar a cabo una dilución 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} del stock de antibiótico (figura 1-B). A continuación, y mediante el uso de un hisopo o bastoncillo de limpieza diaria, se tomará una colonia microbiana y se dispersará sobre la superficie de una placa de agar de cultivo, tal y como se muestra en la figura 2-A. De seguido, los alumnos, con ayuda de unas tijeras limpias, cortarán una superficie de papel de filtro de 0.5 cm × 0.5 cm, aproximadamente, cogiendo los trozos resultantes con la ayuda de unas pinzas. En ningún momento deberán tocar los pliegos de papel con las manos (ya que son una fuente importante de bacterias). Tres discos de papel de filtro se dispondrán con la ayuda de unas pinzas sobre la placa de cultivo, en la que previamente se había inoculado la bacteria, organizando una hipotética estructura triangular, disponiéndolos en los vértices (figura 2-B).

A continuación se dispondrá una gota de la solución de antibiótico 10^{-5} en uno de los discos. Del mismo modo, se dispensará una gota de la dilución 10^{-4} y 10^{-3} en los dos discos restantes (figura 2-C). Este momento de la práctica es el más complicado, tomándose las precauciones precisas para que el antibiótico no rebase el disco de papel. Si no fuera posible, el alumno podría ayudarse sumergiendo el disco de papel, durante unos segundos, en la dilución de antibiótico mediante la ayuda de unas pinzas, para disponerlo –posteriormente– sobre la placa de cultivo microbiano.

La incubación se llevará a cabo a temperatura ambiente durante 48 horas. En el transcurso del tiempo y durante los recreos, los alumnos tomarán nota de lo acontecido en las placas de cultivo. La sorpresa es mayúscula, transcurrido el período de incubación establecido, donde se pondrá de manifiesto la presencia de halos de inhibición del crecimiento microbiano (figura 2-D).

² En microbiología se denominan *bacterias Gram-positivas* a aquellas que se tiñen de violeta tras el uso del colorante cristal violeta-Iodo en la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la pared de las bacterias, presentando una notabilísima capa de mureína o péptido-glicano capaz de retener el complejo pigmento.

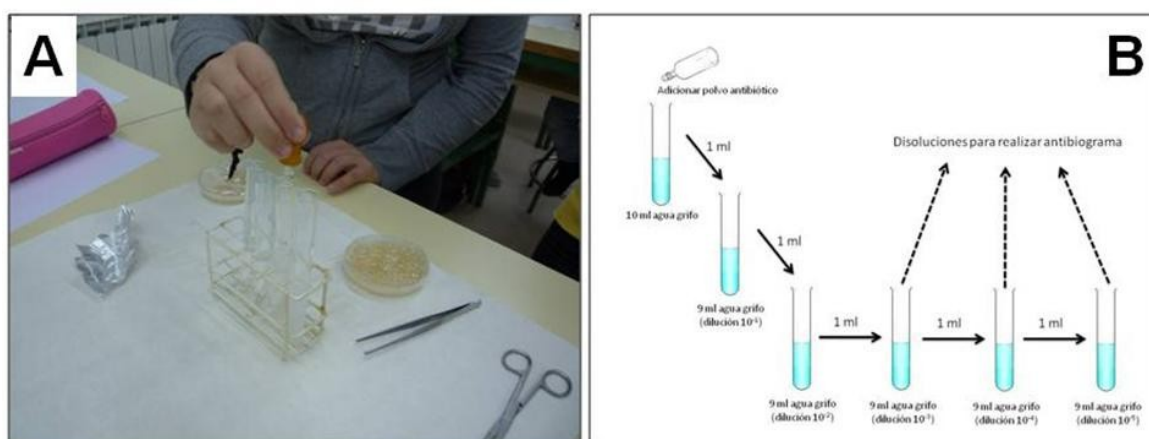


Figura 1. (A) Preparación del antibiótico y dilución posterior mediante el uso de agua de grifo y pipeta Pasteur provista de tetina. (B) Esquema ilustrativo del proceso de dilución seriada.

A lo largo de la experiencia, el profesor responsable de la actividad deberá recordar conceptos básicos de microbiología, como es el caso de:

- *Antibiótico*: sustancia química de origen microbiano, que a bajas concentraciones matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos.
- *Concentración mínima inhibitoria (CMI)*: concentración más baja de un compuesto con capacidad antimicrobiana para matar o inhibir el crecimiento de un cultivo microbiano tras su incubación.
- *Papel ecológico de los compuestos antimicrobianos*: las bacterias productoras de antibióticos podrían alejar o inhibir el crecimiento de otros organismos presentes en el entorno inmediato de la cepa productora.
- *Resistencia bacteriana a los antibióticos*. Uno de los grandes problemas sanitarios en la actualidad es el incremento de la resistencia a los antibióticos más comunes por parte de multitud de cepas bacterianas. La presión selectiva que se ha llevado a cabo a una determinada población microbiana por el uso abusivo de antimicrobianos, conduce a una selección natural específica para ese grupo de microorganismos (Brock y Madigan, 1993). Esta resistencia frente a los antibióticos puede ser consecuencia de propiedades inherentes a la propia población bacteriana, como es el caso de mutaciones espontáneas sobre el material genético, o adquiridas mediante transferencia horizontal de genes (intercambio de plásmidos de resistencia). Este hecho tan importante ha determinado que la Organización Mundial de la Salud (OMS-WHO) haya dedicado el día de la salud (7 de abril de 2011) a llamar la atención a la población, con el objetivo de detener la propagación de la resistencia a los antimicrobianos, mediante la adopción por parte de los países de un paquete de medidas para luchar contra dicha resistencia (<http://www.who.int/world-health-day/2011/es/index.html>):
 - Formular y poner en práctica un plan nacional integral y con financiación suficiente.
 - Fortalecer la capacidad en materia de vigilancia de enfermedades y laboratorio clínico.
 - Procurar el acceso constante a medicamentos esenciales de buena calidad.
 - Regular y promover el uso correcto de los medicamentos³.

³ Es importante recordar al alumno, en este apartado, la obligación de compra de este tipo de medicamento bajo preinscripción médica. Los antibióticos sobrantes deben depositarse en un punto limpio de la ciudad o en las farmacias.

- Mejorar las actividades de prevención y control de las infecciones.
- Fomentar la innovación y la investigación y el desarrollo de nuevas herramientas.

Finalizada la experiencia y como medida básica de higiene, es aconsejable el lavado de las manos con abundante agua y jabón. El material de trabajo de vidrio (tubos de ensayo, placas de Petri provistas del cultivo microbiano...) debe dejarse unas horas en agua con hipoclorito de sodio, previo a su fregado escurpulosos. Aún disponiendo de material fungible desechable, siempre es necesario desinfectarlo unos minutos con lejía, como paso previo a su depósito en el contenedor de recogida de basura.

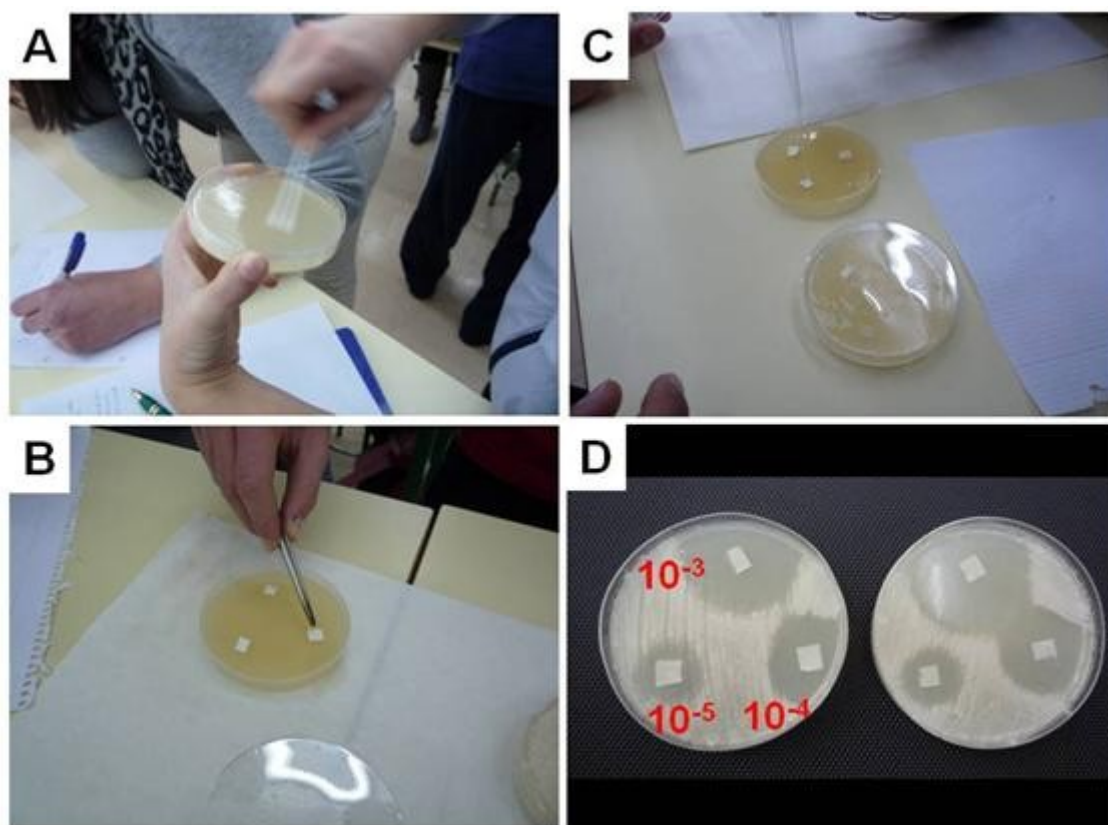


Figura 2. (A) Dispersión del cultivo microbiano, mediante la ayuda de un hisopo, sobre la placa de medio de cultivo. (B) Disposición de los discos de papel de filtro sobre la superficie de la placa, posteriormente a la inoculación de la colonia bacteriana. (C) Inoculación de la dilución de antibiótico mediante la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. (D) Halos de inhibición producidos por el antibiótico sobre un césped de *Bacillus* sp. tras la incubación a temperatura ambiente durante 48 horas. Nótese el diámetro del halo creciente conforme la dilución es menor.

Agradecimientos

Los autores quieren expresar su más sincero agradecimiento a todos los alumnos de 4º de ESO, 1º y 2º de Bachillerato de los IES “Ortega y Rubio” de Mula y “Felipe II” de Mazarrón (cursos 2009-2010 y 2010-2011), así como a los integrantes del curso de formación “Biotecnología en el Aula”, celebrado en el laboratorio de Ciencias Naturales del IES “Príncipe de Asturias” de Lorca-Murcia (14-17 de febrero de 2011) y coordinado por la profesora Irene Méndez Diego. El maravilloso trabajo que llevaron a cabo ha dado como resultado las interesantes imágenes presentadas en esta actividad, así como que la misma vea la luz en esta revista.

Referencias

- Anónimo (2007) Decreto número 291/2007, de 14 de septiembre, por el que se establece el currículo de la Educación Secundaria Obligatoria en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. BORM nº 221. 27179-27303.
- Anónimo (2008) Decreto n.º 262/2008, de 5 de septiembre, por el que se establece el currículo del Bachillerato en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. BORM nº 211. 28023-28168.
- Bauer A.W., C.E. Roberts, W.M. Kirby (1960) Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. *Antibiot. Annu.* 7, 574-80.
- Brock T.D., M.T. Madigan (1993) *Microbiología*. 6ª ed. México: Prentice-Hall. pág. 366.
- López J.P. (2009) Microbiología básica en la educación secundaria obligatoria: el lavado de las manos. *Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien.* 6 (2), 319-324. En línea en: <http://reuredc.uca.es>.