

## Condiciones de microgravedad impactan positivamente la resistencia antibiótica en *Staphylococcus aureus*

Claudia Pérez<sup>1</sup>, Stefany Argueta<sup>2,3</sup>, Priscila Sandoval<sup>4</sup>, Miguel Torres<sup>2</sup>, Pamela Pennington<sup>2,3</sup> y Luis Zea<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Microbiología, <sup>3</sup>Centro de Estudios en Biotecnología, Universidad del Valle de Guatemala,

<sup>4</sup>Colegio Interamericano de Guatemala, <sup>5</sup>BioServe Space Technologies, Departamento de Ciencias de Ingeniería Aeroespacial, Universidad de Colorado Boulder, Boulder, CO, Estados Unidos

fsargueta@uvg.edu.gt

**RESUMEN:** *Staphylococcus aureus* es una bacteria cuyo número de cepas resistentes ha aumentado considerablemente respecto a las susceptibles, dado el incremento en el uso de antibióticos. Estudios recientes sobre bacterias en el espacio demuestran que, algunas reducen su susceptibilidad a los antibióticos en comparación con su respuesta en la Tierra. Esto convierte en una situación preocupante, para la tripulación de los vuelos espaciales de larga duración, en donde patógenos oportunistas son un riesgo potencial de enfermedades infecciosas. La microgravedad y la anaerobiosis del espacio fueron simuladas en este experimento, con el uso de un clinostato, utilizando como control condiciones de gravedad terrestre. En este estudio, *S. aureus* ATCC 25923 se trató con cuatro diferentes concentraciones de carbenicilina, para comparar la respuesta de crecimiento en las condiciones previamente mencionadas. Nuestros resultados demuestran que *S. aureus* alcanza una tasa de crecimiento más elevada en microgravedad simulada que en la gravedad de la Tierra, independientemente del tratamiento de carbenicilina utilizado. Además, se observó que las concentraciones evaluadas de carbenicilina redujeron, pero no inhibieron, el crecimiento de *S. aureus* en condiciones de gravedad terrestre. Finalmente, se considera que son necesarios más estudios sobre mecanismos de resistencia a antibióticos, en condiciones de microgravedad, para completar esta investigación.

**PALABRAS CLAVE:** *S. aureus*, microgravedad simulada, clinostato, resistencia antibiótica, carbenicilina.

### Microgravity conditions boost antibiotic bacterial resistance in *Staphylococcus aureus*

**ABSTRACT:** *Staphylococcus aureus* is a bacterium whose resistant strains have surpassed susceptible strains, with the increasing use of antibiotics. Recent studies on bacteria in space show that some reduce their susceptibility to antibiotics compared to their response on earth. This becomes a major problem for the crew on long-duration space travels, where opportunistic pathogens seem to increment their antibiotic resistance. Microgravity and anaerobic environments were simulated in this experiment with the use of a clinostat, challenging *S. aureus* with four different carbenicillin concentration. It was found that simulated microgravity increased the microbial growth rate in comparison with earth gravity, regardless of the antibiotic treatment. Moreover, it was observed that the evaluated concentrations of carbenicillin reduced, but do not inhibited, the growth of *S. aureus* ATCC 25923 when it grew under conditions of terrestrial gravity. Further analysis of antibiotic resistance mechanism under microgravity condition should be followed to complement this research.

**KEYWORDS:** *S. aureus*, simulated microgravity, clinostat, antibiotic resistance, Carbenicillin.

## Introducción

*Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena para humanos y animales. La mayor parte del ciclo de vida de estas bacterias pasan en estructuras llamadas biopelículas (Neopanel, 2008; Archer, 2011), ya que proporcionan varias ventajas de supervivencia, como la persistencia en ambientes extremos. *S. aureus* comenzó a ser altamente susceptible a las penicilinas, pero como los antibióticos se volvieron de uso común, las cepas resistentes comenzaron a superar a las cepas susceptibles. Hoy en día, es un problema importante en hospitales y países en desarrollo (Fetsch, 2017). En estudios recientes de la Estación Espacial Internacional (ISS, por sus siglas en inglés) sobre contaminación microbiana, las bacterias predominantes fueron miembros del género *Staphylococcus*, aisladas del 84% de las muestras de aire y superficie. *S. aureus* y otras especies patógenas oportunistas se recuperaron con frecuencia (Taylor, 2015). Además, los efectos de los vuelos espaciales sobre la patogenicidad microbiana y los riesgos asociados de enfermedades infecciosas han sido poco estudiados (Wilson, et al. 2007).

Existe un acuerdo general de que la microgravedad representa la mayor influencia sobre la cinética del crecimiento bacteriano y el comportamiento de las células bacterianas durante los vuelos orbitales cortos (Taylor, 2015). Adicionalmente, las bacterias en el espacio aparentemente reducen su susceptibilidad a los antibióticos en comparación con su respuesta en la Tierra (Horneck, et al., 2010). Sin embargo, la susceptibilidad adquirida de las bacterias en el espacio se revierte cuando regresan a la Tierra (Juergensmeyer, et al., 1999). Este fenómeno puede deberse a que, la resistencia bacteriana a los antibióticos depende de variables como la motilidad. Se ha demostrado que el transporte molecular en microgravedad se limita solo a la difusión, y esta podría ser la razón principal por la que las bacterias se vuelven más resistentes a los antibióticos en condiciones extremas en el espacio (Zea, et al., 2016).

La colonización inicial bacteriana de las superficies a bordo del segmento ruso de la ISS se ha investigado recientemente por Taylor (2015). Dicho estudio encontró que los materiales poliméricos, como la poliamida para el marcaje de cables y la aramida Nomex® resistente a las llamas, eran particularmente propensos a la colonización pionera por bacterias gram positivo dominantes del género *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Streptococcus*. Esto indica que la piel de los miembros de la tripulación representa la fuente principal de contaminación temprana.

El presente experimento busca obtener más conocimiento sobre el papel de la microgravedad y sus efectos sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos. En este caso específico se trató la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con diferentes concentraciones de carbenicilina simulando las condiciones espaciales de microgravedad por medio del uso de un clinostato. La hipótesis para este experimento fue que *S. aureus* mostraría

una mayor resistencia a la carbenicilina en condiciones de microgravedad simulada (MGS), en comparación con los controles de régimen de la gravedad de la Tierra (GT). El objetivo fue determinar si las concentraciones de carbenicilina eran efectivas, tanto en los controles de gravedad de la Tierra, como en microgravedad simulada. Adicionalmente, se buscaría comparar el crecimiento de *S. aureus* en ambos regímenes gravitacionales.

## Materiales y métodos

### Preparación de muestras y controles

Se preparó un pre-inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, colocando una colonia de la cepa en 10 ml de caldo Luria Broth (LB), marca Merck. Se dejó incubando 24 h a 37° C con una agitación de 140 rpm.

A partir del pre-inóculo se prepararon inóculos de 450 ml de caldo LB con una densidad óptica bacteriana medida a 600 nanómetros ( $DO_{600nm}$ ) de 0.064, utilizando un espectrofotómetro de barrido UV/Visible SQ-2800 de haz simple, marca Unico. Los 450 mL de caldo LB fueron repartidos en 9 tubos plásticos cónicos de 50 mL, marca Thermo Scientific. Es importante que el tubo se llene completamente para crear un ambiente anaerobio, por lo cual se revisó cada tubo después de cerrarlos para verificar que no hubiera presencia de burbujas. Parte del inóculo fue tomado para realizar una curva de crecimiento.

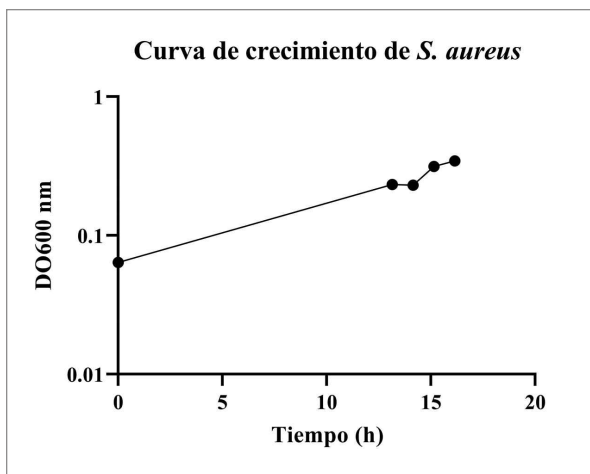
### Curva de crecimiento

Previo a los tratamientos de *S. aureus* con carbenicilina se realizó una curva de crecimiento (Figura 1) con el fin de determinar la  $OD_{600nm}$  a la cual, esta bacteria inicia la fase de crecimiento exponencial.

Esta fase es considerada la fase de crecimiento óptima para aplicar un tratamiento con antibiótico, debido a que existen proteínas importantes y rutas metabólicas vulnerables que pueden ser interrumpidas ocasionando la muerte celular (Levinson, 2016). El inóculo  $DO_{600nm}$  0.064 se dejó creciendo durante 12 horas (overnight), posteriormente la  $DO_{600nm}$  se midió cada hora por triplicado. En la gráfica 1 puede observarse que con una  $DO_{600nm}$  de 0.32 - 0.35 después de 15 y 16 horas de crecimiento, respectivamente, *S. aureus* parece iniciar su fase de crecimiento logarítmico (Romeo, 2018; Stevenson, 2016).

### Crecimiento en Microgravedad Simulada

Los 9 tubos fueron incubados a 37° C alrededor de 18 h, hasta alcanzar la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriana,  $DO_{600nm} \sim 0.5$ , en la cual las células se dividen de forma logarítmica. De los 9 tubos, 5 fueron las muestras experimentales con microgravedad simulada (MGS) por lo que se colocaron



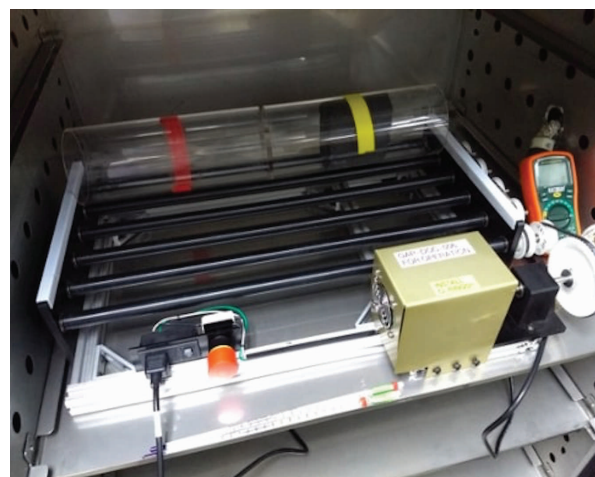
**Figura 1.** Curva de crecimiento de *S. aureus* de 16 horas en medio LB. Un tratamiento antibiótico efectivo para *S. aureus* en medio LB puede iniciarse después de las 16 horas de crecimiento con una  $DO_{600nm} \sim 0.35$ , cuando la bacteria se encuentra en el inicio de la fase exponencial.

dentro de la incubadora, en un Clinostato (BioServe Space Technologies, Cat. No.GAP-A540), que mantuvo las muestras rotando horizontalmente a 10 rpm dentro de un cilindro de policarbonato con 10 cm de diámetro (Figura 2). Este dispositivo utiliza la rotación para anular los efectos de la atracción gravitacional sobre el crecimiento y desarrollo de organismos. En cambio, bajo condiciones de MGS las células están en continua caída libre alcanzando la aceleración provocada por la gravedad (1g).

Los 4 tubos restantes permanecieron estáticos dentro de la misma incubadora experimentando gravedad terrestre (GT). Al alcanzar la fase exponencial, los cultivos de los tubos en MGS y GT fueron repartidos en tubos plásticos cónicos de 15 mL. Se obtuvieron al final, 16 tubos MGS y 13 tubos GT, a los cuales se les agregaron diferentes concentraciones de carbenicilina, teniendo en cuenta que la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) establecida para la cepa *S. aureus* NCTC 6571 es de 0.5 mg/L (no existe reporte de MIC para la cepa *S. aureus* ATCC 25923 en la literatura). Todas las muestras fueron incubadas nuevamente bajo las mismas condiciones de gravedad a 37° C durante 18 h.

### Inhibición del crecimiento por carbenicilina

Se aplicaron 3 diferentes tratamientos de carbenicilina para las 16 y 13 muestras de MGS y GT, respectivamente. Se prepararon 4 tubos MGS controles (sin antibiótico), 4 tubos fueron tratados con 0.25 mg/L de carbenicilina, 4 con 0.5 mg/L y 4 con 1 mg/L. Se realizó el mismo procedimiento para los tubos GT, con la diferencia que, al contar únicamente con 13 tubos se preparó únicamente un tubo control sin antibiótico. Después de incubar durante 18 h a 37° C, se midió por triplicado la  $DO_{600}$



**Figura 2.** Clinostato utilizado durante el taller de microbiología espacial, proveído por BioServe Space Technologies.

de todas las muestras usando microplacas ELISA de 96 pozos de la marca Thermo Scientific. El resultado final de crecimiento bacteriano fue la media de las tres mediciones.

### Análisis estadísticos de resultados

Se realizó un análisis de *t* de Student en InfoStat para comparar las medias entre los valores de densidad óptica medida, entre los tratamientos con carbenicilina y entre las diferentes condiciones de gravedad (GT vs MGS). Se obtuvo la desviación estándar y el valor de *p* de dichas comparaciones. Además, se utilizó el programa estadístico PRISMA para realizar las gráficas y realizar el análisis estadístico ANOVA.

### Resultados

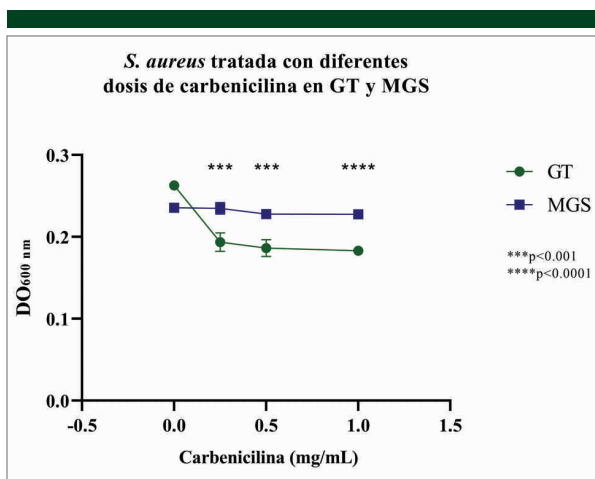
El análisis estadístico ANOVA (Tabla 1) demuestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de densidad óptica de muestras que experimentaron GT o MGS, entre las mismas concentraciones del antibiótico carbenicilina. Para el control negativo bajo GT (muestra sin antibiótico) no se pudo realizar el análisis ya que un error experimental impidió obtener réplicas técnicas. Sin embargo, el resultado de ésta única, muestra en comparación con los diferentes tratamientos de carbenicilina bajo GT sugieren que, en estas condiciones el antibiótico tiene fuerte efecto bacteriostático (Figura 3).

Los cultivos bacterianos estuvieron bajo 36 horas de experimentación, 18 h de previa incubación y 18 h de exposición al antibiótico antes de medir la  $DO_{600}$  final. El error estándar de cada cuadruplicado está indicado en barras pequeñas sobre cada punto de color en la Figura 3. No obstante, no es posible

**Tabla 1.** Análisis estadístico ANOVA para el crecimiento de *S. aureus* entre las muestras de una misma concentración de tratamiento con carbenicilina.

Carbenicilina (mg/mL)	<sup>1</sup> GT media	<sup>2</sup> n	<sup>3</sup> DS	<sup>4</sup> VAR	<sup>5</sup> MSG media	n	DS	VAR
0	0.263	1	-	-	0.2357	4	0.0038	1.47E <sup>-05</sup>
0.25	0.1937	4	0.0114	1.30E <sup>-04</sup>	0.2348	4	0.0071	5.07E <sup>-05</sup>
0.5	0.1863	4	0.0102	1.05E <sup>-04</sup>	0.2279	4	0.0034	1.14E <sup>-05</sup>
1	0.1830	4	0.0058	3.31E <sup>-05</sup>	0.2278	4	0.0026	6.55E <sup>-06</sup>

<sup>1</sup>GT= Gravedad terrestre, <sup>2</sup>n=replicas técnicas, <sup>3</sup>DS= desviación estándar, <sup>4</sup>Var= varianza, <sup>5</sup>MSG= Microgravedad Simulada.



**Figura 3.** Respuesta de *S. aureus* a concentraciones diferentes de carbenicilina en condiciones de GT (verde) y MGS (azul).

establecer conclusiones sobre los controles negativos (sin carbenicilina) puesto que no existen réplicas en el régimen de gravedad de la Tierra.

La Figura 3 ilustra que *S. aureus* crece mejor en condiciones de gravedad terrestre en comparación con microgravedad simulada; sin embargo, el tratamiento con carbenicilina tiene un mayor impacto negativo sobre el crecimiento bacteriano en el régimen gravitacional terrestre ( $p < 0.001$ ) y ( $p < 0.0001$ ). Este hallazgo demuestra que de alguna manera las condiciones de microgravedad simulada estimulan la resistencia al antibiótico carbenicilina en *S. aureus*, creciendo en promedio un 22% más que cuando es tratado con las mismas concentraciones de carbenicilina bajo condiciones de gravedad terrestre.

Por otro lado, las concentraciones de antibiótico no muestran diferencia estadísticamente significativa en la inhibición del crecimiento de *S. aureus* entre muestras del mismo régimen gravitacional (comparación de puntos o cuadros del mismo color). Lo anterior podría indicar que la concentración mínima inhibitoria para esta cepa de *S. aureus* en particular, es mayor a 1 mg/mL, sin embargo, existe la posibilidad de que la inhibición de dicho antibiótico sea únicamente parcial.

## Discusión

Como se observa en la figura 3, los cultivos de *S. aureus* mostraron un crecimiento significativamente mayor en microgravedad simulada (MGS) que en gravedad terrestre (GT), independientemente de la concentración de carbenicilina. Estos resultados concuerdan con Singh y colaboradores (2018) que observaron que la tasa de crecimiento de *S. aureus* es acelerada en microgravedad simulada en comparación con la gravedad normal.

Arunasri y colaboradores (2013) han indicado que las bacterias expuestas a la gravedad reducida muestran una regulación de los genes implicados en la respuesta al hambre, el estrés ácido, el estrés osmótico, el estrés oxidativo, la formación de biopelículas y la biosíntesis de lípidos. Dicho estudio, también resaltó el incremento a la resistencia contra antibióticos y el aumento de la virulencia en diferentes bacterias expuestas a la microgravedad. Existen dos hipótesis principales que podrían explicar el comportamiento de resistencia a antibióticos que se muestra en este estudio.

La primera hipótesis explica la disminución de la interacción de las moléculas de carbenicilina con las células bacterianas. Estudios reportan que, a nivel intracelular la tasa de interacción entre las células bacterianas y las moléculas de antibiótico o transporte de masa es ineficiente, en condiciones de MGS, debido a que las fuerzas de convección, que son dependientes de la gravedad son alteradas (Horneck, *et al.*, 2010). Por consiguiente, la eficacia de la transferencia neta de masa extracelular se reduce y queda limitada a difusión solamente (Zea, *et al.*, 2016).

Esta baja interacción antibiótico-bacteria provoca que las células bacterianas, potencialmente, pueden adaptarse para regenerar su pared más rápido de lo que le toma al antibiótico actuar. Por otra parte, es posible que las células generen nuevos mecanismos de resistencia hacia el antibiótico, como una respuesta ante el estrés generado en dichas condiciones (Aunins, *et al.* 2018).



Según la segunda hipótesis, en las condiciones del experimento, se esperaba una mayor eficiencia en la generación de biopelículas. La formación de dichas estructuras puede ser una respuesta al estrés ambiental (Arunasri, *et al.* 2013), o bien un proceso normal del desarrollo y la proliferación celular en algunas bacterias (Horneck, *et al.*, 2010). En ambos casos, esta matriz extracelular no solo ayuda a las células bacterianas a mantenerse adheridas, sino también contribuyen a la retención de agua y nutrientes. Estudios en la ISS reportaron que bacterias gram negativo, tal como *Pseudomonas aeruginosa* y gram positivo, de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*, forman biopelículas de una manera más rápida y eficiente en condiciones de microgravedad, que en gravedad terrestre (Taylor, 2015).

Por lo anteriormente descrito es probable que, la resistencia a carbenicilina observada en MGS por *S. aureus*, se deba a la sinergia de ambos mecanismos. Sin embargo, se necesita más investigación para poder confirmar el o los mecanismos de resistencia específicos.

Los resultados de este trabajo, al igual que estudios similares, indican que las condiciones de un vuelo espacial simulado podrían ser las responsables de producir señales celulares que inducen cambios a nivel molecular en las bacterias. Además, estos resultados también proporcionan evidencia de que esta señal puede alterar la virulencia de un patógeno microbiano (Wilson, *et al.* 2007), dado el mayor crecimiento en condiciones de microgravedad.

Es importante que futuros estudios analicen con mayor detalle las interacciones moleculares y celulares de distintos patógenos oportunistas, como lo es *S. aureus*. De esta forma, se tendrá una mejor comprensión de los mecanismos que llevan a cabo las bacterias para aumentar su resistencia ante antibióticos y el posible aumento de virulencia. Esta información es vital para las personas que realizan viajes espaciales y cuya salud se ve comprometida y para los investigadores que realicen estudios sobre la resistencia a antibióticos *per se*, problemática que necesita soluciones urgentes e innovadoras.

## Conclusiones

Los resultados de esta investigación evidencian y apoyan la hipótesis de que, microorganismos patógenos como *S. aureus* pueden aumentar su resistencia a antibióticos en condiciones de microgravedad, por mecanismos que necesitan ser investigados con mayor profundidad. Este hallazgo es de suma importancia, puesto que está en riesgo la salud de astronautas que constantemente realizan viajes al espacio.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Embajada de los Estados Unidos en Guatemala a través de la oportunidad de

financiamiento DOS-GUA-F18. Esta serie de experimentos se diseñaron e implementaron durante el Taller de Microbiología Espacial realizado en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología en la Universidad del Valle de Guatemala, del 16 al 20 de julio de 2018. Reconocemos a BioServe Space Technologies por permitirnos usar su Clinostato.

## Bibliografía

- Andrews, J.M. (2001) *Determination of minimum inhibitory concentrations* Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48: 5-16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., Shirtliff, M.E. (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease Virulence 2(5): 445-459. doi:10.4161/viru.2.5.17724
- Arunasri, K., Adil, M., Yenu Charan, K., Suvro, C., Himabindu Reddy, S., Shivaji, S. (2013) *Effect of Simulated Microgravity on E. coli K12 MG1655 Growth and Gene Expression* PLoS ONE 8(3): e57860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057860>
- Aunins, T.R., Erickson, K.E., Prasad, N., Levy, S.E., Jones, A., Shrestha, Sh., Mastracchio, R., Stodiek, L., Klaus, D., Zea, L., Chatterjee, A. (2018) *Spaceflight modifies Escherichia coli gene expression in response to antibiotic exposure and reveals role of oxidative stress response* Frontiers in Microbiology 9 (310): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00310>
- Fetsch, A. (2017) *Staphylococcus aureus* Academic Press, London, 316p.
- Horneck, G., Klaus, D.M., Mancinelli, R.L. (2010) *Space Microbiology* Microbiology and Molecular Biology Reviews 74 (1): 121-156. doi:10.1128/MMBR.00016-09
- Juergensmeyer, M., Juergensmeyer, E., Guikema, J. (1999) *Long-term exposure to spaceflight conditions affects bacterial response to antibiotics* Microgravity Science and Technology 12(1): 41-7. DOI: 10.1117/12.975009
- Levinson, W. (2016) *Review of Medical Microbiology and Immunology* Fourteenth Edition, chapter 3 Growth. United States of America: McGraw-Hill Education, 832p.
- Neopane, P., Nepal, H.P., Shrestha, R., Uehara, O., Abiko, Y. (2018) *In vitro biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance* International Journal of General Medicine 11: 25-32. doi:10.2147/IJGM.S153268
- Romeo, L., Lanza Cariccio, V., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., Mazzon, E. (2018) *The  $\alpha$ -Cyclodextrin/Moringin Complex: A New Promising Antimicrobial Agent against Staphylococcus aureus* Molecules (Basel) 23 (9): 2097. doi:10.3390/molecules23092097
- Singh, S. *et al.* (2018) *Investigation of change in the growth, morphology, cell membrane using FTIR technique, and cell surface hydrophobicity of Staphylococcus aureus in simulated microgravity condition* 42nd COSPAR Scientific Assembly. Vol. 42.
- Taylor P.W. (2015) *Impact of space flight on bacterial virulence and antibiotic susceptibility*. Infection and drug resistance 8, 249-262. doi:10.2147/IDR.S67275
- Wilson, J.W., Ott, C.M., Höner zu Bentrup, K., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., Nickerson, C.A. (2007) *Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(41): 16299-16304. doi:10.1073/pnas.0707155104
- Zea L, Prasad N, Levy SE, Stodiek L, Jones A, Shrestha S, et al. (2016) *A Molecular Genetic Basis Explaining Altered Bacterial Behavior in Space* PLoS ONE 11 (11): e0164359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164359>